

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS
DEPARTAMENTO DE FÍSICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FÍSICA

HENRIQUE DOS SANTOS

**ESTUDO DA INFLUÊNCIA NA RESPOSTA BIOATIVA DE VITROCERÂMICAS
PRODUZIDAS A PARTIR DO SISTEMA VÍTREO BORO-SÓDIO-CÁLCIO COM
DIFERENTES TAMANHO DE PARTÍCULAS**

Maringá

2023

HENRIQUE DOS SANTOS

**ESTUDO DA INFLUÊNCIA NA RESPOSTA BIOATIVA DE VITROCERÂMICAS
PRODUZIDAS A PARTIR DO SISTEMA VÍTREO BORO-SÓDIO-CÁLCIO COM
DIFERENTES TAMANHO DE PARTÍCULAS**

Dissertação apresentada à Universidade Estadual de Maringá, como requisito parcial para a obtenção do título de mestre.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Francielle Sato

Maringá

2023

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao apoio de todos que me acompanharam neste período da minha vida. Principalmente a minha orientadora Prof^a. Dr^a. Francielle Sato por todo o conhecimento compartilhado. Também aos professores Dr. Wilson Ricardo Weinand, Dr. Antônio Medina Neto, Dr. Vitor Santaella Zanuto, Dr. Robson Ferrari Muniz, Dr^a. Lidiane Vizioli de Castro Hoshino e a todos os integrantes do DFI e PFI. Também a Mônica pela atenção e disposição e auxílio prestado.

Agradeço a todas as amigas que cresceram no período em laboratório, os alunos e professores integrantes dos grupos GEOPT, GEF e GDDM em especial a Ma. Mariana Sversut Gibin, Guilherme Tel e Ana Carolina Ferreira.

Minha maior gratidão eu dedico as pessoas que compartilharam a vida comigo nesse período, Gabi, Leticia e principalmente a minha “colega de dívida” com a qual compartilhei moradia Ma. Luana Vitorino Gushiken Passianoto que sempre esteve ao meu lado em todos meus momentos no meu tempo de mestrando e se tornou uma grande amiga que levarei para a vida toda.

A minha família por todo apoio incondicional que me foi dado em toda minha existência, especialmente meu avô “*in memoriam*” Antônio Gonçalves que nos deixou no início de 2023.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e à Financiadora de Estudos e Projetos (Finep) pelo apoio financeiro. À Universidade Estadual de Maringá (UEM), ao Complexo de Centrais de Apoio à Pesquisa (COMCAP), ao Grupo de Estudos Multidisciplinares do Ambiente (GEMA), ao Prof. Dr. Gustavo do Grupo de Desenvolvimento e Inovação em Dispositivos Multifuncionais (GDDM) da UEM, o Laboratório de Inovação Tecnológica no Desenvolvimento de Fármacos e Cosméticos (LITDFC), o Prof. Dr. Marcelo Augusto Batista do Departamento de Agronomia da UEM. À Profa^a. Dr^a. Franciana da Universidade Estadual Federal do Maranhão (UFMA), Prof^a. Dr^a. Andressa da Universidade Estadual de Ponta Grossa (UEPG) pela infraestrutura disponível e demais alunos dos grupos de pesquisa que contribuíram para a realização deste trabalho.

Aos membros da banca examinadora, pela disponibilidade em participar da defesa de mestrado e pelas contribuições acerca deste trabalho.

Agradeço à todos que diretamente ou indiretamente contribuíram para este trabalho.

Obrigado!

“Gerônimo”

RESUMO

O presente trabalho estudou a resposta bioativa de vitrocerâmicas produzidas a partir do sistema vítreo $60\text{B}_2\text{O}_3 - 5\text{CaF}_2 - 19\text{Na}_2\text{O} - 14\text{CaO} - 2\text{P}_2\text{O}_5$ pulverizado em diferentes intervalos de tamanho de partículas, sendo em três intervalos: abaixo de $103\ \mu\text{m}$, entre 60 e $201\ \mu\text{m}$ e 118 e $342\ \mu\text{m}$, denominados, respectivamente, por P1, P2 e P3, os quais foram compactados e tratados termicamente, a 715°C , de forma que ocorresse a sinterização de partículas. Análises de DRX mostram a formação de fases cristalinas nas amostras, sendo detectadas principalmente as fases CaNaB_5O_9 , $\text{CaNa}_3\text{B}_5\text{O}_{10}$ e Fluorapatita. Técnicas de espectroscopia Raman e FTIR-ATR detectaram também a fase CaB_2O_4 que é classificada como fase secundária nas amostras. As micrografias obtidas por MEV das amostras mostrando que o tamanho de partícula influenciou principalmente na morfologia de superfície e interna. Os ensaios de bioatividade *in vitro* foram feitos utilizando o método de imersão num período de 28 dias em SBF. A micrografia das amostras, após imersão, mostraram formações de camadas de fosfato de cálcio já nas primeiras horas de interação com o fluido, indicando boa resposta bioativa das amostras. Análises de DRX, espectroscopia Raman e FTIR-ATR para as amostras após imersão, mostraram a degradação das fases de Boro, que foram dissolvidas no meio. Por fim, os ensaios de citotoxicidade mostraram que P1, P2 e P3 não apresentaram toxicidade celular, podendo ter aplicabilidade biológica.

Palavras-chave: Biomaterial, Vidro Bioativo de Borato, Vitrocerâmica, Tamanho de Partícula.

ABSTRACT

The present work studied the bioactive response of glass-ceramics produced from the vitreous system $60\text{B}_2\text{O}_3 - 5\text{CaF}_2 - 19\text{Na}_2\text{O} - 14\text{CaO} - 2\text{P}_2\text{O}_5$ pulverized in different particle size intervals, in three intervals: smaller than $103\ \mu\text{m}$, between $60 - 201\ \mu\text{m}$ and $118 - 342\ \mu\text{m}$, called, respectively, by P1, P2 and P3, which were compacted and thermally treated, at 715°C , so that the sintering of particles occurred. XRD analyzes show the formation of crystalline phases in the samples, being detected mainly the phases CaNaB_5O_9 , $\text{CaNa}_3\text{B}_5\text{O}_{10}$ and Fluorapatite. Raman spectroscopy and FTIR-ATR techniques also detected the CaB_2O_4 phase, which is classified as a secondary phase in the samples. The micrographs obtained by SEM of the samples showing that the particle size influenced mainly on the surface and internal morphology. The *in vitro* bioactivity assays were performed using the immersion method in a period of 28 days in SBF. The micrograph of the samples, after immersion, showed formation of layers of calcium phosphate in the first hours of interaction with the fluid, indicating a good bioactive response of the samples. DRX analysis, Raman spectroscopy and FTIR-ATR for the samples after immersion, showed the degradation of the boron, phases that were dissolved in the medium. Finally, the cytotoxicity assays showed that P1, P2 and P3 did not show cellular toxicity, which may have biological applicability.

Keywords: Biomaterial, Borate Bioactive Glass, Vitroceramics, Particle Size.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Estrutura a) cristalina b) vítrea de SiO_4 . Adaptado de [14].	19
Figura 2: Mudança na entalpia durante o resfriamento de um líquido. T_g representam as regiões de temperatura de transição vítrea; T_m a temperatura de fusão. Adaptado de [15].	21
Figura 3: Unidades superestruturais possíveis em vidro borato: (a) anel boroxol, (b) anel borato, (c) grupo diborato, (d) anel de metaborato, (e) cadeia metaborato e (f) piroborato. Sendo \emptyset os átomos de oxigênio ligados. Adaptado de [15].	22
Figura 4: Processos de a) nucleação e cristalização e b) sinterização de vidros. Adaptado de [19].	23
Figura 5: Dinâmica de interação de vidros bioativos em imersão em solução de fosfato. Adaptado de [36].	29
Figura 6: Fotos do Vidro Borato Bioativo 60B5F2P e das pastilhas 60B5F2P-715 em diferentes tamanho de partícula. Imagem foi obtida por uma câmera de smartphone e ao fundo papel milimetrado.	31
Figura 7: Ilustração da disposição da amostra em imersão em SBF. Adaptado de [34].	35
Figura 8: Distribuição de tamanho de partícula após peneiramento em peneiras de faixas de mesh conhecido, sendo: P3 entre 180 e 250 μm , P2 entre 93 e 125 μm e P1 < 62,5 μm .	38
Figura 9: Termograma do vidro bioativo 60B5F2P, em pó, nas granulometrias P1, P2 e P3, sendo P1 < P2 < P3. Em destaque as regiões de temperaturas características de transição de fase no vidro, as linhas verdes são indicadores visuais.	39
Figura 10: Difratoograma de Raios-X do vidro bioativo 60B5F2P em diferentes faixas de tamanho de partícula P1 (9 - 103 μm), P2 (60 - 201 μm) e P3 (118- 342 μm).	41
Figura 11: Difratoograma das amostras P1, P2 e P3 com indexação das fases CaNaB_5O_9 (JCDPS # 078-0294) em roxo, $\text{CaNa}_3\text{B}_5\text{O}_{10}$ (JCDPS # 078-0295) em verde e FA (JCPDS # 071-0881) em laranja. Os gráficos circulares mostram a análise semiquantitativa utilizando o método RIR.	42
Figura 12: Espectros Raman das amostras com diferentes tamanhos de partícula P1, P2 e P3 (P3 > P2 > P1) e do vidro 60B5F2P (peça).	44
Figura 13: Espectros Raman após tratamento térmico em 715 °C das amostras 60B5F2P, P1, P2 e P3 com a indexação das fases cristalinas: Fluorapatita (laranja)	

RRUFF #R40098-3[61], CaNaB_5O_9 em roxo [41], $\text{CaNa}_3\text{B}_5\text{O}_{10}$ em verde [60] e CaB_2O_4 em rosa [62].	45
Figura 14: Espectro FTIR-ATR do vidro biativo 60B5F2P e das amostras em diferentes tamanhos de partícula P1, P2 e P3 ($P_3 > P_2 > P_1$).	47
Figura 15: Espectros FTIR-ATR após tratamento térmico em 715 °C das amostras 60B5F2P, P1, P2 e P3 com a indexação das fases cristalinas: Fluorapatita (laranja) RRUFF #R40098-3[61], CaNaB_5O_9 em roxo [41], $\text{CaNa}_3\text{B}_5\text{O}_{10}$ em verde [60] e CaB_2O_4 em rosa [62].	48
Figura 16: Micrografias das superfícies das amostras P1, P2 e P3 após o tratamento térmico em 715 °C obtidas via MEV, os círculos vermelhos são indicadores visuais...	50
Figura 17: Micrografias das fraturas das amostras P1, P2 e P3 após o tratamento térmico em 715 °C obtidas via MEV, os círculos vermelhos são indicadores visuais.	51
Figura 18: Variação do pH da solução de imersão (A) e do percentual da perda de massa (B) em função do tempo de imersão para as amostras P1, P2 e P3.	52
Figura 19: Concentração de íons de A) Calcio (Ca); B) Fósforo (P); na solução em função do tempo de imersão das amostras P1, P2 e P3.	53
Figura 20: Razão Ca/P das amostras P1, P2 e P3 em função do tempo de imersão obtidas a partir da análise de EDS. A faixa hachurada indica a região a qual o valor da razão Ca/P correspondente aos valores da razão do composto ACP.	55
Figura 21: Micrografias das superfícies das amostras P1, P2 e P3 em função do tempo de imersão em SBF. As setas vermelhas são indicadores visuais mostrando o início de formação de camada na superfície das amostras.	57
Figura 22: Micrografia das fraturas das amostras P1, P2 e P3 em função do tempo de imersão em SBF. As setas vermelhas são indicadores visuais mostrando as formações de camadas apatíticas no interior das amostras.	58
Figura 23: Quantidades das fases A) CaNaB_5O_9 ; B) $\text{CaNa}_3\text{B}_5\text{O}_{10}$ e C) Fluorapatita em função do tempo de imersão obtida pelo método RIR.	59
Figura 24: Espectros Raman das amostras (A) P1, (B) P2 e (C) P3 nos períodos 0, 0.25, 1, 4, 7, 14, 21 e 28 dias de imersão com a indexação das fases cristalinas: Fluorapatita (laranja) RRUFF #R40098-3[61], CaNaB_5O_9 em roxo [41], $\text{CaNa}_3\text{B}_5\text{O}_{10}$ em verde [60] e CaB_2O_4 em rosa [62]. As linhas tracejadas e hachuradas destacam as mudanças espectrais nas fases $\text{CaNa}_3\text{B}_5\text{O}_{10}$ e CaB_2O_4 ; t = 0 indica a amostra sem imersão em SBF.	61

Figura 25: Espectros Raman da amostra P1 nos períodos 0, 0,25, 1, 4, 7, 14, 21 e 28 dias de imersão destacando os picos atribuídos as unidades trigonais de BO_3	62
Figura 26: Espectros Raman da amostra P2 nos períodos 0, 0,25, 1, 4, 7, 14, 21 e 28 dias de imersão destacando os picos atribuídos as unidades trigonais de BO_3	62
Figura 27: Espectros Raman da amostra P3 nos períodos 0, 0,25, 1, 4, 7, 14, 21 e 28 dias de imersão destacando os picos atribuídos as unidades trigonais de BO_3	62
Figura 28: Espectros FTIR-ATR das amostras (A) P1, (B) P2 e (C) P3 nos períodos 0, 0.25, 1, 4, 7, 14, 21 e 28 dias de imersão com a indexação das fases cristalinas: Fluorapatita (laranja) RRUFF #R40098-3[61], CaNaB_5O_9 em roxo [8], $\text{CaNa}_3\text{B}_5\text{O}_{10}$ em verde [60] e CaB_2O_4 em rosa [62]. As linhas tracejadas e região hachurada destacam variações espectrais. O (*) destaca a banda em 1336 cm^{-1} ; t = 0 indica a amostra sem imersão em SBF.	64
Figura 29: Viabilidade celular das amostras P1, P2 e P3, nas concentrações 100, 400, 700 e 1000 ug/ml; ns indica que não há diferença estatística significativa entre as análises de cada concentração.	65
Figura A 1: Micrografia do pó do vidro bioativo 60B5F2P peneirado com peneira de mesh <62 um.	68
Figura A 2: Micrografia do pó do vidro bioativo 60B5F2P peneirado por peneira de mesh entre 93,0 e 125,0 μm	69
Figura A 3: Micrografia do pó do vidro bioativo 60B5F2P peneirado por peneira de mesh entre 180,0 e 250,0 μm	69
Figura A 4: Difrátogramas da amostra P1 nos tempos de imersão: 0, 0.25, 1, 4, 7, 14, 21 e 28 dias. Sendo as fases $\text{CaNa}_3\text{B}_5\text{O}_{10}$, CaNaB_5O_9 e FA representadas respectivamente pelos símbolos: ●, ◆ e *; O tempo t = 0 significa a amostra sem imersão.	70
Figura A 5: Difrátogramas da amostra P2 nos tempos de imersão: 0, 0.25, 1, 4, 7, 14, 21 e 28 dias. Sendo as fases $\text{CaNa}_3\text{B}_5\text{O}_{10}$, CaNaB_5O_9 e FA representadas respectivamente pelos símbolos: ●, ◆ e *; O tempo t = 0 significa a amostra sem imersão.	71
Figura A 6: Difrátogramas da amostra P3 nos tempos de imersão: 0, 0.25, 1, 4, 7, 14, 21 e 28 dias. Sendo as fases $\text{CaNa}_3\text{B}_5\text{O}_{10}$, CaNaB_5O_9 e FA representadas respectivamente pelos símbolos: ●, ◆ e *; O tempo t = 0 significa a amostra sem imersão.	72

Figura B 1: Representação esquemática de um sistema de DSC, onde é monitorada a temperatura do meio T_0 e comparada com a temperatura das amostras ΔT_A e da referência ΔT_R resultando em uma diferença de temperatura ΔT . Adaptado de [84]. ...	73
Figura B 2: Exemplo de curva de DTS de um vidro, destacando as temperaturas características de T_g , T_p e T_m . Adaptado de [11].....	74
Figura B 3: Elementos de simetria necessários para cada sistema cristalino os símbolos \bullet , \blacklozenge , \blacktriangle representam os eixos de simetria. Adaptado de [88].....	75
Figura B 4: Componentes principais de um Difratorômetro de Raios-X. Adaptado de [87].	77
Figura B 5: Difratoograma de um vidro de SiO_2 em comparação com o difratoograma de Quartzo obtido a partir do tratamento térmico da rede vítrea de SiO_2 . Adaptado de [86].	78
Figura B 6: Ilustração de a) balanço, b) torção, c) tesoura e d) vibrações de balanço no grupo a CH_2 , e) vibração de torção e f) vibração de respiração do anel; as setas e símbolos + e - indicam o sentido de vibração. Adaptado de [90].	79
Figura B 7: Ilustração de um caminho óptico em um cristal ATR de reflexão única. Adaptado de [93]	80
Figura B 8: Ilustração do espalhamento Raman Stokes e Anti-Stokes. v_L : comprimento de onda incidente v_m : comprimento de onda espalhado. Adaptado de [93].	81
Figura B 9: Ilustração dos componentes básicos do MEV. Adaptado de [99].	82
Figura B 10: Diagrama esquemático de um espectrômetro de emissão atômica de plasma de micro-ondas. Adaptado de [100].	84

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Composição do 60B5F2P em % de massa (wt.) e mol.....	30
Tabela 2: Reagentes utilizados na produção do SBF na ordem de dissolução [34].	34
Tabela 3: Caracterização térmica do vidro bioativo 60B5F2P, em pó, com diferentes tamanhos de partículas obtidos a partir do termograma das análises de DSC. ($T \pm 5$)°C e ($\Delta T \pm 10$)°C.	40
Tabela B 1: Parâmetros de rede cristalina [86].....	75

LISTA DE ABREVIÇÕES

ACP	Fosfato de cálcio amorfo
CaB ₂ O ₄	Calciborite
CaNa ₃ B ₅ O ₁₀	Pentaborato Trissódico de Cálcio
CaNaB ₅ O ₉	Pentaborato de Sódio e Cálcio
COD	Crystallography Open Database
COMCAP	Complexo de Centrais de Apoio à Pesquisa
DRX	Difratometria de Raios-X
DSC	Differential Scanning Calorimetry
DTA	Differential Thermal Analysis
EDS	Detector de Energia Dispersiva
FA	Fluorapatita
FTIR-ATR	Espectroscopia no Infravermelho por Transformada de Fourier acoplada a Reflectância Total Atenuada
HÁ	Hidroxiapatita
ICDD	International Center for Diffraction Data
ICSD	Inorganic Crystal Structure Database
JCPDS	Joint Committee of Powder Diffraction Standards
MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura
pH	Potencial hidrogeniônico
SBF	Simulated Body Fluid
T _g	Temperatura de transição vítrea
T _l	Temperatura de início de fusão
T _x	Temperatura de início de cristalização
T _m	Temperatura de fusão

SUMÁRIO

1 – INTRODUÇÃO.....	16
2 – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	19
2.1 – Vidros.....	19
2.1.1 – Vidros Borato.....	22
2.2 – Vitrocerâmicas.....	23
2.3 – Dinâmica de Partículas.....	24
2.4 – Biomateriais.....	25
2.4.1 – Vidros e Vitrocerâmicas Bioativas.....	27
2.5 – Mecanismo de Formação de Camada.....	28
3 – MATERIAIS E MÉTODOS.....	30
3.1 – Preparação das amostras.....	30
3.2 – Análise de tamanho de partícula.....	31
3.3 – Análise Térmica.....	32
3.4 – Difractometria de Raios-X (DRX).....	32
3.5 – Espectroscopia Raman.....	32
3.6 – Espectroscopia no Infravermelho por Transformada de Fourier – Refletância Total Atenuada (FTIR-ATR).....	33
3.7 – Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV).....	33
3.8 – Avaliação de Bioatividade (<i>in vitro</i>).....	34
3.9 – Avaliação de pH e perda de massa.....	35
3.10 – Espectroscopia de Emissão em Plasma de Micro-Ondas (MP-AES).....	35
3.11 – Avaliação da viabilidade celular pelo método colorimétrico MTT.....	36
4 – RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	37
4.1 – Parte I – Pré-Imersão.....	37
4.1.1 – Tamanho de partícula.....	37
4.1.2 – Calorimetria exploratória diferencial (DSC).....	38
4.1.3 – Difractometria de Raios-X (DRX).....	40
4.1.4 – Espectroscopia Raman.....	43
4.1.5 – Espectroscopia no Infravermelho por transformada de Fourier.....	46
4.1.6 – Análise morfológica por Microscopia Eletrônica de Varredura.....	49
4.2 – Parte II – Pós- Imersão em SBF.....	52
4.2.1 – Avaliação de pH, perda de massa e análise de íons.....	52
4.2.2 – MEV e EDS.....	53
4.2.3 – DRX.....	59

4.2.4 – Espectroscopia Raman	59
4.2.5 – Espectroscopia FTIR-ATR.....	62
4.2.6 – Teste de Citotoxicidade	65
5 – CONCLUSÃO.....	67
APÊNDICE A	68
A.1 MEV.....	68
A.2 DRX.....	70
APÊNDICE B.....	73
B.1 Análise Térmica	73
B.2 Difractometria de Raios-X.....	74
B.3 Espectroscopia Vibracional.....	78
B.3.1 Espectroscopia FTIR	79
B.3.2 Espectroscopia Raman.....	80
B.4 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV).....	82
B.5 Espectroscopia de Emissão em Plasma de Micro-Ondas (MP-AES)	83
REFERÊNCIAS	85

1 – INTRODUÇÃO

O avanço tecnológico possibilitou o desenvolvimento de materiais voltados para aplicações biológicas como implantes, enxertos e materiais que auxiliam na recuperação tecidual ocorrida em fraturas, esfoliações e cirurgias, eles melhoram o bem-estar de pacientes e aceleram o processo de recuperação e reabilitação [1].

Ao se tratar de fraturas e defeitos ósseos o desenvolvimento de materiais biologicamente compatíveis e com pouca taxa de rejeição tecidual é um desafio que tem sido superado com a produção de vidros e vitrocerâmicas com propriedades físicas e químicas que se comparam ao tecido ósseo. O desenvolvimento de um material que tenha baixa rejeição deve apresentar certas características intrínsecas, tais como: envolvimento direto na formação óssea, condução celular, vascularização, não toxicidade e tensão mecânica [2].

Os vidros bioativos são materiais inorgânicos que têm sido usados em forma granular, *books* e pastilhas para preencher defeitos ósseos. Eles atendem a muitos critérios de matrizes transportadoras ideais, incluindo biocompatibilidade e osteocondutividade, além de serem biodegradáveis. Por conta destas propriedades os vidros bioativos tem grande potencial de aplicação como portadores de proteínas morfogenéticas óssea, que fazem parte de um grupo de fatores de crescimento também conhecidos como citocinas e metabólógenos, podendo ser empregados como transportador de matriz óssea nativa [3, 4].

As vitrocerâmicas são compostas por estruturas moleculares organizadas, sendo obtidas por meio do tratamento térmico de vidros podendo ser formadas diferentes fases cristalinas em suas composições. Elas podem ser produzidas diretamente de uma peça de vidro ou a partir do vidro pulverizado. A depender do tamanho de partícula ao qual o vidro é pulverizado pode se manipular os formatos de acordo com a necessidade da aplicação do material, ampliando regiões e aplicações ao qual as peças produzidas podem ser utilizadas [5].

Em aplicações biomédicas os vidros e vitrocerâmicas podem ser utilizados na forma de estruturas monolíticas ou como partículas maiores que 100 μm de diâmetro como materiais regenerativos ósseos demonstrando propriedades antimicrobianas e anti-

inflamatórias, que são potencialmente muito promissores para uma variedade de aplicações nas áreas da medicina regenerativa. Cerruti e colaboradores [6], que estudam os efeitos do pH na reatividade do BioGlass® mostraram que algumas das etapas de dissolução levam à formação de camadas de fosfatos de cálcio na superfície do biovidro ocorrem quando pequenas partículas do biomaterial (< 2 mm) são dissolvidas. Além disso, em trabalhos posteriores, estudaram a influência de diferentes tamanhos de partículas na resposta bioativa do vidro, os resultados mostraram que a precipitação rápida de uma camada de fosfato de cálcio e a maior energia de superfície retardou o processo de difusão para partículas menores [7]. Da Cruz e colaboradores [8], estudaram a influência do tamanho de partículas de dois tipos de hidroxiapatita, que é um material proveniente do minério de ossos composto por fosfato de cálcio hidratados, a fim de avaliar as características físico químicas e biocompatibilidade do material, em testes *in vivo* e concluíram que quanto maior o tamanho de partícula maior a resposta inflamatória do material. No trabalho de Granito e Colaboradores [9] que investigou os efeitos de diferentes biomateriais na regeneração óssea de ratos, observou que quanto menor o tamanho de partícula implantada mais rápida será a reabsorção do biomaterial.

O avanço da engenharia de materiais permite a manipulação dos biomateriais a fim de formar diferentes morfologias e formatos, podendo ser adaptados a diferentes tecidos biológicos. Neste viés, os de vidros bioativos tem sido empregados na produção de estrutura que proporcionam sustento e regeneração óssea, denominados de *scaffolds*. Do ponto de vista morfológico, os *scaffolds* devem possuir uma porosidade adequada, com uma rede bem desenvolvida de poros interconectados cujo tamanho deve exceder 100 µm, a fim de promover a penetração celular, o crescimento tecidual e a vascularização, devendo apresentar uma bioatividade controlada, uma taxa de absorção compatível com a taxa de regeneração óssea natural, um comportamento mecânico comparável ao do osso natural [10]. A produção desses materiais, utilizando vidros bioativos, pode ser feita por meio do vidro pulverizado e compactado e essas peças são então tratadas termicamente a fim de agrupar as partículas, dando sustentação a peça formada. Porém, a depender da temperatura de tratamento térmico, o vidro pode transicionar do estado metaestável vítreo de estrutura desorganizada para uma estrutura de organização periódica, formando cristais, dando lugar a formação de vitrocerâmicas formadas a partir da matriz vítrea.

A peça formada pelo tratamento térmico do vidro macerado e compactado pode apresentar os mais diferentes formatos estruturais, apresentando porosidades e interconexão entre os poros, essa característica promove a osteointegração no interior do material que auxilia na fixação e suporte do tecido biológico.

Tendo em vista que a morfologia do biomaterial pode influenciar na compatibilidade com o tecido biológico, o presente trabalho propõe o estudo do desenvolvimento de vitrocerâmicas formadas a partir de vidros boratos bioativos pulverizados e separados em diferentes intervalos de tamanhos de partícula, para avaliar a influência desse na sua resposta bioativa.

Neste estudo foram empregadas diferentes técnicas a fim de caracterizar a composição cristalina, estrutura molecular, morfologia e dinâmica de resposta biológica. Para isto foi utilizada a técnica de difratometria de Raios-X, avaliando a estrutura das amostras e composições das fases cristalinas baseada nos componentes predecessores do vidro. É usado também as espectroscopias no infravermelho e Raman para determinar a composição molecular da amostra de acordo com a busca bibliográfica referente as análises obtidas pela difratometria de Raios-X. Para os testes de bioatividade as amostras passaram por análises *in vitro* utilizando o método de imersão em simulador de fluido corpóreo, as quais foram analisados com respeito a taxa de dissociação da amostra no meio, formação de camadas de fosfato de cálcio nas superfícies das amostras, alteração de pH da solução e micrografias via imagens de microscopia, com o intuito de mostrar a mudança morfológica das amostras após interação com o meio de imersão. O trabalho se inicia apresentando uma revisão bibliográfica acerca do tema da dissertação, tendo como enfoque a produção e caracterização de biomateriais. Em seguida são mostradas as técnicas experimentais utilizadas para produção, caracterização e análises das amostras. Posteriormente são exibidos os resultados e a discussão, e por fim a conclusão do trabalho.

2 – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Neste capítulo é apresentada uma breve revisão bibliográfica sobre vidros, vitrocerâmicas e biomateriais.

2.1 – Vidros

Os primeiros vidros usados pela humanidade foram encontrados na natureza, na produção de facas, pontas de flechas entre outras ferramentas de corte. Esses vidros foram obtidos da obsidiana, resultado do resfriamento de lava, e podem conter uma grande variedade de componentes como alcalinos terrosos e óxidos de metais de transição. Independente da composição, o principal constituinte é a sílica. Apesar dos primeiros vidros serem compostos principalmente por sílica, a partir de 1900 surgiram também os vidros contendo fósforo e Boro como componentes principais, sendo nomeados como vidros fosfatos e borato, respectivamente [11].

O vidro é reconhecido principalmente pela sua transparência óptica e com estrutura em rede compactada, Figura 1. Essas redes são compostas em tetraedros conectados em todos os quatro cantos, mas, diferente de um cristal, as redes não são periódicas e simétricas e não se estendem em todas as dimensões, caracterizando um material isotrópico [12].

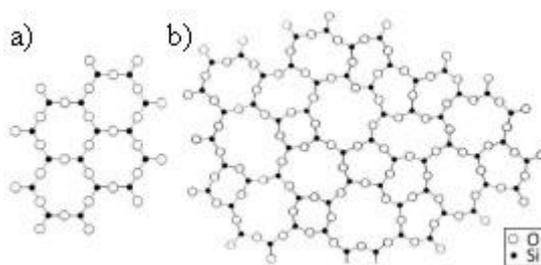


Figura 1: Estrutura a) cristalina b) vítrea de SiO_4 . Adaptado de [14].

Em temperatura ambiente, os vidros se comportam como sólidos, apresentando rigidez, porém em nível microscópico apresentam estruturas semelhantes a líquidos, o que dá ao vidro a denominação de líquido super-resfriado e sólido não cristalino [16].

Diferente de sólidos cristalinos, que ao serem aquecidos apresentam uma temperatura característica para a mudança de fase, ou seja, há uma mudança abrupta do estado sólido para o líquido. Já o processo para a formação de um material em estado

vítreo não é notado uma temperatura específica para a transição de fase que passa do sólido para um líquido muito viscoso e então para líquido. Para a obtenção de um vidro por meio do resfriamento, é necessário que o material atinja uma certa temperatura chamada de temperatura de transição vítrea (T_g), esta temperatura depende da composição do vidro e da taxa de resfriamento. Quanto maior a taxa de resfriamento, maior a temperatura de transição. Logo, para se obter um vidro por meio de resfriamento é necessário um cuidado extra com o tempo [13].

Para a obtenção de um vidro é necessário que o mesmo, quando fundido, seja resfriado abaixo da temperatura de transição vítrea. Em um diagrama de entalpia em função da temperatura, Figura 2, podemos considerar um material com um certo volume em uma temperatura acima da temperatura de fusão. Quando o líquido é resfriado a estrutura atômica do fundido irá mudar de acordo com a temperatura na qual o fundido é mantido. Resfriar o material abaixo da temperatura de fusão de cristal, resultaria na formação de um arranjo atômico periódico de longo alcance. Quando isso ocorre a entalpia diminui drasticamente até o valor apropriado para formar um cristal. Porém, se o líquido puder ser resfriado abaixo da temperatura de fusão do cristal sem cristalização, obtém-se um líquido super-resfriado. À medida que o líquido é resfriado, ocorre o aumento da viscosidade. A uma certa temperatura a viscosidade se torna tão grande que os átomos não conseguem mais se rearranjar para atingir o equilíbrio. Neste ponto a entalpia começa a desviar da linha de equilíbrio, seguindo uma curva de declive gradualmente decrescente, até que finalmente passa a ser determinada pela capacidade calorífica do líquido congelado, ou seja, a viscosidade torna-se tão grande que a estrutura do líquido se torna fixa e não é mais dependente da temperatura [11].

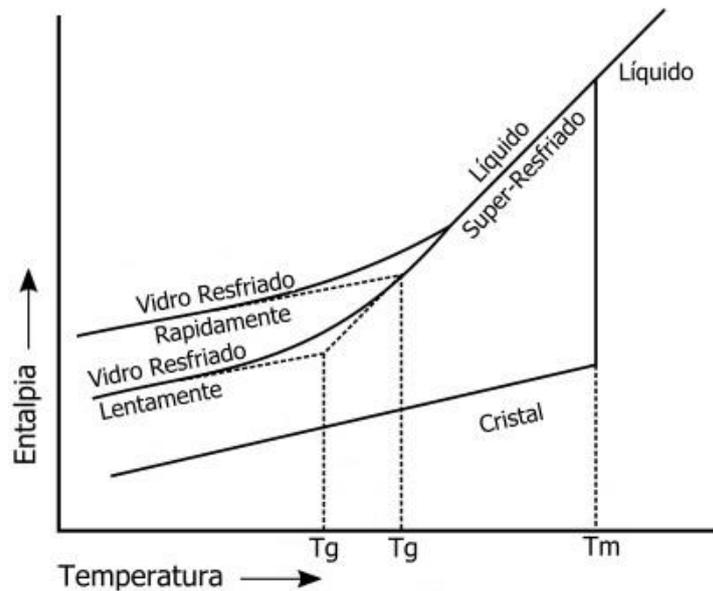


Figura 2: Mudança na entalpia durante o resfriamento de um líquido. T_g representam as regiões de temperatura de transição vítrea; T_m a temperatura de fusão. Adaptado de [15].

A região que delimita equilíbrio entre o líquido e o sólido congelado é chamada de região de transformação vítrea, nessa região temos T_g . Com uma taxa de resfriamento mais lenta a entalpia do material entra em equilíbrio para temperaturas mais baixas, assim formando um fluido completamente congelado [11].

Além do controle de resfriamento do fundido, os materiais precursores do vidro devem ser devidamente selecionados para a função que cada um exerce na formação da matriz vítrea. Há os formadores de rede que são responsáveis por conectar à rede como um todo, gerando a distribuição tridimensional aleatória característica de vidros, os principais agentes formadores são SiO_2 , P_2O_5 e B_2O_3 [11, 12]. Os agentes fundentes são usados para diminuir a temperatura de fusão dos agentes formadores de rede, pois a alta temperatura de fusão dificulta a obtenção de vidros. Os agentes fundentes são principalmente óxidos de metais alcalinos, como cálcio, lítio, sódio entre outros. Também há os agentes modificadores de rede que controlam os efeitos colaterais dos agentes fundentes na formação da rede vítrea, entre esses materiais se encontram os metais alcalino-terrosos e óxidos de metais de transição e principalmente óxido de alumínio. Por último temos os agentes de refino são usados na composição do vidro para remoção de bolhas no fundido e são adicionados em quantidades muito pequenas, porém são de grande importância para garantir a qualidade final do produto. Dentre esses materiais se encontram KNO_3 , NaNO_3 , NaCl , fluoretos como CaF_2 , NaF , Na_3AlF_6 e alguns sulfatos.

É importante notar também que o mesmo material pode ser usado para diferentes finalidades, como por exemplo o CaF_2 , que pode ser usado também como um agente fundente [11, 12, 17, 16].

2.1.1 – Vidros Borato

Apesar dos vidros não terem arranjo atômico periódico a longo alcance como cristais, a curta distância os vidros mantêm uma ordem dependente da composição. Em vidros borato o Boro tende a se conectar com 3 oxigênios, formando unidades de BO_3 triangulares planares, que se encontram em forma aleatória na matriz vítrea, conectados por pontes de oxigênio formando um sistema de anéis boroxol (B_3O_6), os quais por sua vez são conectados a outros anéis boroxol por unidades de BO_3 isolados [12].

A presença de óxidos modificadores em estruturas vítreas causa a quebra das pontes de oxigênio. Porém, em vidros borato a adição de modificadores acarreta a mudança na coordenação dos grupos trigonais de BO_3 para grupos tetraédricos BO_4^- com carga negativa e para equilíbrio de carga um cátion modificador é ligado à rede. Esses novos grupos podem se rearranjar em anéis com um ou dois tetraedros, podendo formar estruturas maiores como diboratos entre outras estruturas vítreas que são ilustradas na Figura 3 [12, 15]. Entretanto, com o aumento da adição de modificadores a formação de grupos tetraédricos retornam às unidades trigonais diminuindo o grau de polimerização da matriz vítrea, formando pontes de oxigênio não ligantes que formarão anéis e cadeias de metaborato e piroborato [11, 15, 16].

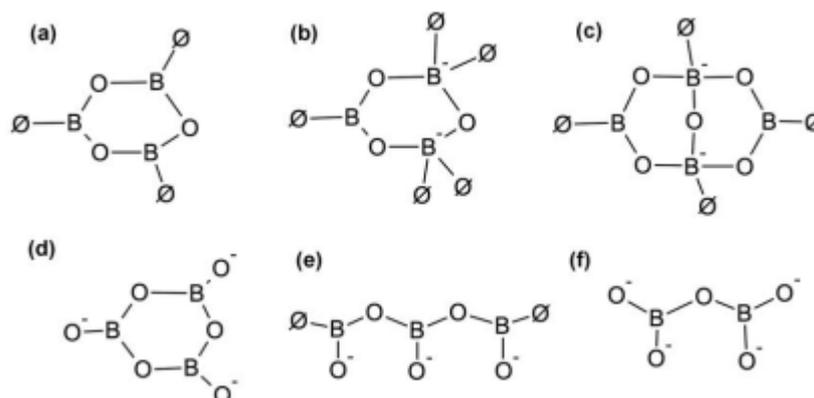


Figura 3: Unidades superestruturais possíveis em vidro borato: (a) anel boroxol, (b) anel borato, (c) grupo diborato, (d) anel de metaborato, (e) cadeia metaborato e (f) piroborato. Sendo \emptyset os átomos de oxigênio ligados. Adaptado de [15].

2.2 – Vitrocerâmicas

A vitrocerâmica provém do tratamento térmico de um material vítreo, sendo necessário seu aquecimento em temperaturas acima da temperatura de transição vítrea. Acima dessa temperatura característica, o material que se encontra em estado amorfo passa pelo processo de nucleação, que consiste na formação de rede cristalinas a partir da estrutura amorfa do vidro por meio da diminuição da energia livre do sistema, então ocorre o processo de estruturação tridimensional dos arranjos atômicos e formada uma rede bidimensional de estrutura organizada e periódica, assim formando um sólido cristalino. Este processo pode ser caracterizado por uma curva de liberação de calor em análises de DTA e DSC [11, 18].

No estado vítreo o vidro apresenta núcleos indetectáveis, após atingir a temperatura de transição vítrea ocorre o crescimento dos núcleos que antes não eram vistos a olho nu, o desenvolvimento dos núcleos acarreta a diminuição da viscosidade do vidro. Ao atingir temperatura suficiente para a cristalização a fluidez e nucleação do vidro é interrompida devido à resistência de liberação de calor, e então ocorre a reestruturação molecular do material que passa a apresentar estrutura periódica e organizada, característica de cristais [18]. Os processos de nucleação e cristalização são ilustrados na Figura 4.

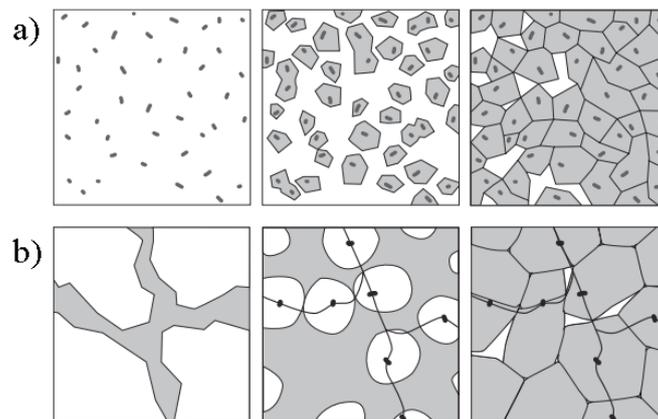


Figura 4: Processos de a) nucleação e cristalização e b) sinterização de vidros. Adaptado de [19].

Por ser uma estrutura metaestável o vidro apresenta certa fragilidade mecânica quando comparável a vitrocerâmica, a qual tem grande resistência a ruptura relativa. Além disso, também apresenta as mais diversas propriedades luminescentes, magnéticas, entre outras que são aplicáveis em diferentes áreas de pesquisa [19].

O processo de cristalização ocorre de duas formas, sendo a primeira e mais comum a heterogênea, quando a cristalização acontece a partir dos núcleos espalhados pela rede vítrea do material, criando cristais em diferentes pontos do material até que ocorra a completa formação da vitrocerâmica. Já o segundo mecanismo de cristalização decorre de forma homogênea a partir do desenvolvimento de fases a partir dos constituintes da matriz vítrea. Apesar da diferença entre os do processo de cristalização homogêneo e heterogêneo, ambos acontecem a partir da superfície do vidro, desencadeando a formação de cristais até as camadas mais internas do material [11, 18, 19].

Ao se tratar de vidro pulverizado, o processo de cristalização ocorre de forma similar a nucleação heterogênea, chamado de sinterização. Autores como Matusita, Ray e Yi Hu, estudaram a dinâmica de cristalização de vidros em função do tamanho de partícula. De forma geral, os trabalhos mostraram que a energia necessária para que ocorra a sinterização do pó de vidro compactado cresce com o tamanho de partícula. Fatores como do tempo de exposição a temperatura e da pressão aplicada no momento da compactação, também são fatores que influenciam na cristalização do material [20 - 24].

2.3 – Dinâmica de Partículas

Como mencionado anteriormente, existem vários parâmetros que devem ser levados em consideração no processo de sinterização de vitrocerâmicas. Adequando e padronizando o tratamento térmico de vidros pulverizados, o tamanho de partícula se mostra o único fator que pode influenciar na formação de nucleação e conseqüentemente cristalização e sinterização de vidros pulverizados e compactados. Para partículas maiores a área de superfície efetiva, ou seja, a razão entre volume e área, é menor quando comparado a partículas menores. Assim, quando o processo de nucleação, que ocorre de forma unidimensional, inicia da superfície para o interior do vidro, as partículas menores estarão sujeitas a maiores dinâmicas de cristalização [24].

Com isso, pode-se esperar temperaturas de transições de estados diferentes para intervalos de tamanho de partículas diferentes. Em curvas de análises térmicas, menores tamanhos de partículas apresentam temperatura características de transições vítreas (T_g), cristalização (T_p) e fundição (T_m) menores [23]. Pelo fato de partículas menores terem maior área de superfície efetiva, as transições vítreas de um mesmo vidro podem ocorrer

de forma mais abrupta que para peças maciças, uma vez que a nucleação no interior do vidro acontece após a total cristalização da superfície [22].

O processo de sinterização leva a aglomeração de partículas cristalinas, o que pode causar alteração no processo de cristalização devido a presença de núcleos vítreos ainda não cristalizados que retardam os processos de difusão térmica, podendo criar estruturas não homogêneas formadas tanto por vidro quanto cerâmicas, dando origem a vitrocerâmicas com diferentes fases cristalinas [20]. Logo, ao se tratar da produção de vitrocerâmicas, devem ser avaliadas as condições de disposição de material, adequando os parâmetros de formação de cristais a finalidade que é esperada do produto formado pelo tratamento térmico [21].

2.4 – Biomateriais

Com o avanço científico e tecnológico, a busca por melhoramento no tratamento de tecidos biológicos deteriorados devido a ferimentos, acidentes, envelhecimento, doenças e outros fatores que podem prejudicar a saúde humana, ocorre em várias áreas do conhecimento, como: biologia, engenharia, medicina, física e química sempre buscando materiais que auxiliem na regeneração ou até na substituição de tecidos. Os materiais que apresentam essa capacidade de auxiliar na regeneração de tecidos, acelerar ou induzir crescimento de células e até mesmo terem propriedades semelhantes o bastante para que possa ser feita a substituição dos tecidos pelos mesmos são chamados de biomateriais [1].

Apesar das pesquisas em biomateriais terem se intensificando cada vez mais, a utilização de materiais para reparação de partes do corpo humano tem registros históricos que evidenciam a substituição de dentes humanos por dentes bovinos, fixados por fios de ouro, datadas de 600 a.C. [25, 26].

O termo biomaterial foi introduzido à comunidade científica nos anos de 1960, juntamente com a criação da Sociedade Americana e Européia de Biomateriais que, em seu primeiro, congresso definiu que qualquer substância ou combinação de substância, que não sejam drogas, de origem animal ou sintética que podem ser usadas por um período de tempo, como parte ou como um todo de sistemas que tratam, aumentam ou substituem quaisquer tecidos, órgãos ou funções do corpo é dita como sendo um

biomaterial. Posteriormente materiais com essas propriedades passaram a ser definidos como a primeira geração de biomateriais. Atualmente biomateriais são definidos como: materiais com propósito de interagir com sistemas biológicos para avaliar, tratar, aumentar ou repor quaisquer tecidos, órgão ou função do corpo [25].

Os primeiros biomateriais foram direcionados a reparos de órgãos, com o mínimo de toxicidade para o hospedeiro sendo majoritariamente bioinertes. Ligas metálicas são exemplos desse tipo de material. Com o avanço da pesquisa e tecnologia, a próxima geração de biomateriais foi desenvolvida de forma que o material pudesse interagir com o tecido biológico podendo ser reabsorvidos pelo sistema, como vidros, vitrocerâmicas e polímeros de origem sintética ou natural [25, 27].

A geração seguinte de biomaterias foi desenvolvida pela engenharia de tecidos, sendo destinada a produção de materiais capazes de regenerar e induzir crescimento de tecidos vivos. Exemplos desses materiais são cimentos ósseos reabsorvíveis, cartilagem, peles artificiais e *scaffolds* de vidro, vitrocerâmicas e cerâmicas bioativas [28].

Há também biomateriais que são desenvolvidos com o intuito de auxiliar na regeneração de tecidos por meio de estímulos bioelétricos. Além disso, esses materiais possibilitam o monitoramento eletrônico do efeito do material quando implantado *in vivo*, bem como fornecendo informações para fins de diagnósticos, contribuindo em pesquisas clínicas. Materiais a base de carbono, polímeros condutores piezoelétricos que respondem a sinais elétricos externos, são usados para esse tipo de aplicação [29].

As substâncias utilizadas como biomateriais ou em sua produção devem apresentar alguns requisitos essenciais, tais como: biocompatibilidade - o material implantado deve promover a integração junto ao tecido sem sofrer a liberação de substâncias tóxicas; resistência a processos de esterilização como o condicionamento a radiação gama, gás oxi-etileno e autoclavagem sem perder a suas propriedades; biofuncionalidade - deve apresentar propriedades adequadas para a região específica na qual será utilizado e manufaturabilidade - capacidade de fabricação e produção do material [27 - 29].

Os biomaterias têm diferentes modos de serem dispostos a depender do tecido tratado, a fim de proporcionar melhor integração entre a substancia do biomaterial e o tecido. Assim, os biomateriais se classificam principalmente como: Inertes, que para que haja interação e crescimento com o tecido onde o material foi implantado, é necessário

que os mesmos sejam fixados por meio de parafusos ou ataduras; porosos que são fixados por meio de crescimento de tecidos através de poros formando uma ligação mecânica; bioativos, ao serem implantados devem ser capazes de se ligarem aos tecidos por meio de crescimento de camadas formadas por trocas iônicas, dissolução e precipitação; reabsorvíveis que após a implantação são absorvidos e posteriormente substituídos pelos tecidos remanescentes do local de aplicação do mesmo, nesta classe de materiais podemos citar como exemplo as vitrocerâmicas e vidros bioativos [28 - 30].

2.4.1 – Vidros e Vitrocerâmicas Bioativas

O primeiro vidro bioativo foi desenvolvido por Hench na década de 1960, quando pesquisava meios de melhorar a rejeição do corpo humano aos implantes que eram feitos principalmente por metais e polímeros sintéticos. A intenção de Hench era criar um material capaz de formar camadas de Hidroxiapatita (HA) que por consequência não seria rejeitado pelo corpo. A camada formada pelo material é uma importante etapa para adesão do material ao tecido celular [30].

O vidro criado por Hench é feito a partir de uma base de silicato cuja composição é $45\text{SiO}_2 - 24,5\text{Na}_2\text{O} - 24,5\text{CaO} - 6\text{P}_2\text{O}_5$ que posteriormente foi registrado sobre a marca *Bioglass*[®] [30], essa composição apresenta uma boa resposta bioativa, com dissociação compatível com o processamento celular ósseo. Vidros bioativos a base de silicato apresentam dissociação lenta, sendo ideais para regiões que precisam de tempo para cicatrizar. Diferente dos vidros silicatos, vidros a base de Boro tem baixa resistência química, o que torna sua absorção rápida, sendo mais indicado para tecidos moles [32].

O tratamento térmico de vidros acarreta a formação de vitrocerâmicas, formando diferentes fases cristalinas no material, o que pode influenciar em sua resposta bioativa. Ademais, a produção de vitrocerâmicas possibilita o desenvolvimento de *scaffolds* a partir do vidro pulverizado e compactado por meio da mistura de materiais formadores de poro com o pó de vidro [31]. A vitrocerâmica apresenta melhor resistência mecânica e química quando comparada ao vidro bioativo, o que possibilita diversas aplicações em diferentes tipos de tecidos biológicos, empregando devida manufatura do vidro [32, 33].

Um dos modos de avaliar a bioatividade de um material é o teste *in vitro* por imersão em simulador de fluido corpóreo, o SBF, do inglês *Simulated Body Fluid*,

desenvolvido por Kokubo e Takadama. O SBF, possui propriedades similares a composição do plasma sanguíneo, de tal forma que quando utilizado como solução para imersão, provoca reações químicas no material que desencadeiam a formação de camadas apatíticas em sua superfície e, em caso de materiais porosos, nos interstícios [34].

2.5 – Mecanismo de Formação de Camada

Como denotado anteriormente, um material que têm por característica formar camadas apatíticas em sua superfície quando em contato com tecidos biológicos é dito biocompatível [30]. Segundo Hench e Wilson [35], a formação da camada segue algumas etapas. Primeiro, dois estágios envolvem as reações de troca iônica entre os íons modificadores da rede vítrea, como os íons de Cálcio, Sódio e Hidrogênio do meio que promovem a hidrólise de grupos de sílica, seguida pela formação de Si – OH na superfície do vidro. No estágio três ocorre a condensação e polimerização de uma camada rica em SiO₂ na superfície, enquanto o estágio quatro implica na migração íons de Ca²⁺ e PO₄³⁻ do SBF para a camada rica em SiO₂ levando à formação de camada de fosfato de cálcio amorfo (ACP). No estágio final, absorção de íons adicionais do meio, como OH⁻, CO₃²⁻ e Na⁺ na camada ACP, promove a conversão de ACP em HA via cristalização [36].

Vidros à base de borato seguem um mecanismo semelhante de formação da camada de HÁ, conforme descrito para vidros à base de silicato, exceto pela formação da camada rica em SiO₂. A taxa de dissolução é mais rápida do vidro de borato quando comparada ao silicato, devido à sua menor durabilidade química, sendo esta considerada principal razão por trás da rápida taxa de deposição de material semelhante a HA em sua superfície. Quando os vidros de borato são imersos em uma solução diluída de fosfato, ocorre primeiro a dissolução dos íons de Sódio e BO₃³⁻ da estrutura do vidro para a solução. Então, assume-se que os íons PO₄³⁻ do meio reagem com os íons Ca²⁺ levando à nucleação e crescimento de HA [36]. É ilustrado na Figura 5 a dinâmica de formação de camada e dissociação de vidros silicato e borato.

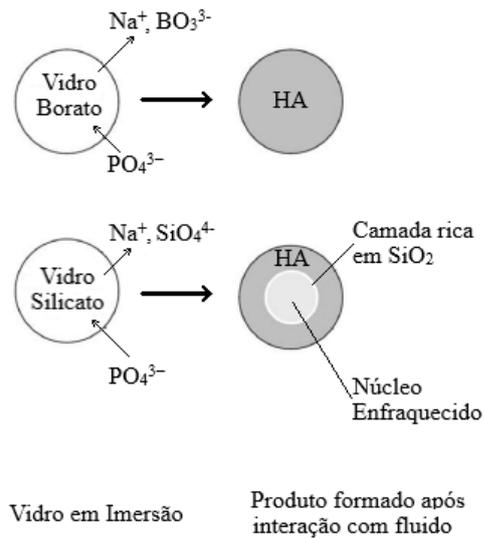


Figura 5: Dinâmica de interação de vidros bioativos em imersão em solução de fosfato. Adaptado de [36].

A dinâmica de formação de camada em vitrocerâmicas é similar à que ocorre nos vidros, sendo que a dissociação ocorre a partir da decomposição dos cristais, a fim de liberar os íons formadores. É sabido também que a composição do vidro, carga superficial, tipos de meio e as condições de teste são os fatores com maior influência que afetam a nucleação de apatita em materiais bioativos [37].

3 – MATERIAIS E MÉTODOS

Neste capítulo estão descritos os procedimentos e técnicas experimentais para preparação e análise das amostras estudadas.

3.1 – Preparação das amostras

As amostras usadas neste trabalho são de um vidro a base de Boro, do sistema vítreo $60\text{B}_2\text{O}_3 - 5\text{CaF} - (20-x)\text{Na}_2\text{O} - (15-x)\text{CaO} - (2x)\text{P}_2\text{O}_5$, com ($x = 1$), o qual foi estudado previamente em nosso grupo e em colaboração com a Universidade Federal do Maranhão, campus de Imperatriz, resultando em teses de doutorado e dissertação de mestrado [38 – 41]. Na tese de doutorado de Portes [38], a amostra denominada BV2, composta pela estequiometria $60\text{B}_2\text{O}_3 - 5\text{CaF} - 19\text{Na}_2\text{O} - 14\text{CaO} - 2\text{P}_2\text{O}_5$ apresentou os melhores resultados nos testes de bioatividade *in vitro*. Posteriormente, o BV2 foi tratado termicamente, resultando na dissertação de mestrado de Gibin [41], que mostrou boa bioatividade nas vitrocerâmicas obtidas. Diante dos bons resultados prévios da bioatividade e ensaios biológicos, foi escolhida para este trabalho a amostra BV2 tratada termicamente em 715°C , denominada daqui em diante como 60B5F2P-715, para o estudo da influência do tamanho de partícula na bioatividade da vitrocerâmica de borato. O vidro borato BV2 sem tratamento térmico será denominado de 60B5F2P.

Todos os reagentes utilizados na produção do vidro 60B5F2P são da marca Sigma Aldrich[®], com grau de pureza entre 98 e 99,99%, e estão descritos na Tabela 1 os seus respectivos percentuais em massa (wt.) e mol. Os reagentes tiveram suas massas aferidas em uma balança analítica Shimadzu modelo UW220D com precisão de 0,1mg. Inicialmente o CaCO_3 e o Na_2CO_3 passaram pelo processo de degaseificação, que consiste em retirar o gás carbônico dos reagentes, afim de obter os óxidos CaO e Na_2O que são aquecidos e mantidos por uma hora, respectivamente em 900°C e 450°C . Após este passo, os reagentes foram homogeneizados e transferidos para um cadinho de platina, que foi colocado em um forno convencional para fusão.

Tabela 1: Composição do 60B5F2P em % de massa (wt.) e mol.

	B_2O_3	CaF_2	Na_2O	CaO	P_2O_5
wt. (%)	60	5	19	14	2
mol (%)	57,8	4,1	20,5	16,7	0,9

A fusão da mistura dos reagentes ocorreu em 1100°C e permaneceu por 15 minutos para homogeneização. Após esse passo o fundido é vertido em um molde de aço inoxidável, aquecido a 450°C (abaixo da transição vítrea do vidro), sofrendo um rápido resfriamento. Em seguida, para a eliminação de tensões internas e estabilização da fase amorfa do vidro, ele foi tratado termicamente a 450°C por 6 horas e resfriado por inércia térmica até a temperatura ambiente, na Figura 6 é exibida o vidro após preparo.

Após a produção do vidro, o material foi pulverizado em um almofariz de ágata e então peneirado em peneiras de nylon em três intervalos de tamanho de partícula: < 62,5µm, entre 93,0 e 125,0µm e entre 180,0 e 250,0µm. Posteriormente o pó em cada intervalo de tamanho de partícula foi compactado por 10 minutos em uma prensa hidráulica uniaxial Struers modelo Tempopress 2, com pressão de 55MPa, utilizando um molde cilíndrico de 5mm de diâmetro e 2mm de espessura. Após a prensagem, as amostras foram tratadas termicamente por 2 horas a 715°C com uma taxa de aquecimento de 3°C/min em atmosfera ambiente, as pastilhas prontas são mostradas na figura 6. Denominamos as amostras de acordo com o intervalo de tamanho de partícula: < 62,5µm, entre 93,0 - 125,0µm e entre 180,0 - 250,0µm.

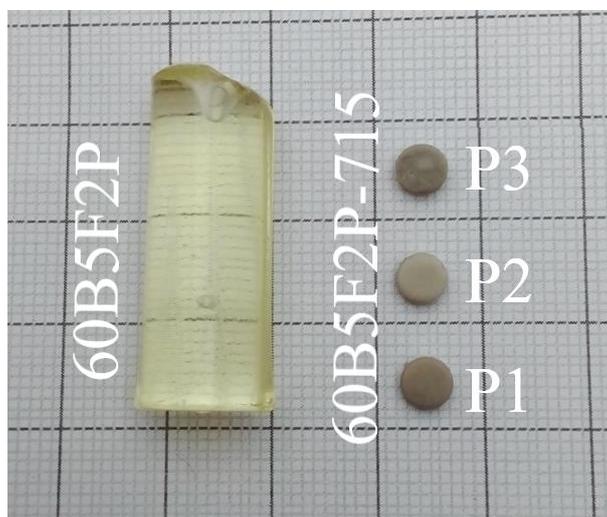


Figura 6: Fotos do Vidro Borato Bioativo 60B5F2P e das pastilhas 60B5F2P-715 em diferentes tamanho de partícula. Imagem foi obtida por uma câmera de smartphone e ao fundo papel milimetrado.

3.2 – Análise de tamanho de partícula

A Análise de tamanho de partícula foi feita por um analisador de partículas Bettersizer modelo Laser Particle Size Analyser Bettersizer S2-WD, utilizando o método de espalhamento MIE equipado com uma fonte de excitação em 635nm, pertencente ao

Grupo de Estudos Multidisciplinares do Ambiente (GEMA), da Universidade Estadual de Maringá (UEM). O pó previamente selecionado nos três intervalos de tamanho de partícula, foi depositado no porta amostra em suspensão por ultrassom com água destilada por 2 minutos antes da análise. O resultado da medida é uma média de 3 varreduras.

3.3 – Análise Térmica

A análise térmica foi realizada em um analisador termogravimétrico da Shimadzu modelo DTG-60, pertencente ao Laboratório de Análises Térmicas (LAT) da Universidade Federal do Maranhão – Campus Imperatriz (UFMA), em colaboração com a Prof^a. Dr^a. Franciana Pedrochi, a fim de determinar as temperaturas características de transição de fase das amostras. As medidas foram realizadas com o vidro pulverizado nos três intervalos de tamanho de partícula em cadinhos de platina, com taxa de aquecimento de 3°C/min de temperatura ambiente até 900°C, em atmosfera controlada por fluxo de Nitrogênio com vazão de 40ml/min.

3.4 – Difratomia de Raios-X (DRX)

A obtenção dos difratogramas das amostras antes e pós imersão em SBF foi feita utilizando um difratômetro de raios-X Shimadzu modelo XDR – 7000, pertencente ao Grupo de Desenvolvimento e Inovação em Dispositivos Multifuncionais (GDDM), da Universidade Estadual de Maringá (UEM), por meio da aplicação de radiação K α vinda do cobre, sobre tensão de 35kV e 30mA de corrente. As amostras em pó, nos três intervalos de granulometria, foram dispostas em um porta amostra de vidro e cada medida foi realizada em temperatura ambiente com passo de 0,3°/min de 7° a 65°.

3.5 – Espectroscopia Raman

Os espectros Raman foram adquiridos em um microscópio Raman Confocal Bruker Optik GmbH, Ettlingen DEU modelo Senterra, pertencente ao Complexo de Centrais de Apoio à Pesquisa (COMCAP), da Universidade Estadual de Maringá (UEM), com fonte excitação laser em 532nm, potência nominal de 20 mW, sendo este focado na superfície das amostras integras, antes e pós imersão em SBF, utilizando uma lente de magnificação

de 20x. Todas as análises foram realizadas em temperatura ambiente e cada espectro foi obtido com a seguinte configuração: tempo de aquisição de 3s, resolução espectral de 3 a 5cm^{-1} no intervalo de 1800 a 300cm^{-1} , cada medida é a média de 30 varreduras. Todos os espectros foram normalizados pelo vetor normalização e submetidos a correção de linha de base utilizando o *software* OPUS.

3.6 – Espectroscopia no Infravermelho por Transformada de Fourier – Refletância Total Atenuada (FTIR-ATR)

Os espectros foram obtidos a partir do pó das amostras, antes e pós imersão em SBF, por meio de um Espectrômetro no Infravermelho com Transformada de Fourier Bruker Optik GmbH, Ettlinger DEU modelo Bruker Vertex 70v FTIR, acoplado a um acessório de Refletância Total Atenuada (ATR) modelo Platinum ATR Unit A225 com cristal de diamante, pertencente ao Complexo de Centrais de Apoio à Pesquisa (COMCAP), da Universidade Estadual de Maringá (UEM). Os espectros foram obtidos de 4000 a 400cm^{-1} com resolução espectral de 4cm^{-1} , sendo cada espectro uma média de 128 varreduras. Todas as medidas foram realizadas a temperatura ambiente e os espectros normalizados pelo vetor normalização e submetidos a correção de linha de base utilizando o *software* OPUS.

3.7 – Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

A análise morfológica da superfície e da fratura das amostras antes e pós imersão em SBF, foram realizadas utilizando um microscópio eletrônico de varredura FEI modelo Quanta 250, pertencente ao Complexo de Centrais de Apoio à Pesquisa (COMCAP) da Universidade Estadual de Maringá (UEM). As amostras foram inicialmente metalizadas com a deposição de pós de ouro em *stubs* e as imagens foram feitas em diferentes ampliações provenientes do feixe de elétrons acelerado a 20keV . As análises de EDS foram obtidas utilizando um sensor de energia dispersiva da *Oxford Instruments* modelo AZtecOne.

3.8 – Avaliação de Bioatividade (*in vitro*)

Os ensaios de bioatividade, *in vitro*, das amostras foram feitos a partir da imersão das peças em SBF, preparado em acordo com o protocolo desenvolvido por Kokubo e Takadama [34]. A Tabela 2 apresenta os reagentes e quantidades utilizadas. Os testes de bioatividade são realizados a fim de avaliar o crescimento de camadas de fosfato de cálcio, também chamada de apatítica, sobre a superfície do biomaterial.

O SBF foi preparado separando 700ml de água ultrapura (Mili-Q®) em um béquer plástico, posteriormente aquecido e mantido em 36,5°C por meio de um banho térmico. Após atingida a estabilidade térmica, os reagentes presentes na Tabela 2 foram adicionados ao recipiente seguindo a respectiva ordem, de modo que o próximo reagente seja adicionado a mistura após o reagente anterior ter sido completamente dissolvido na solução com o auxílio de um agitador magnético. Após a diluição de todos os reagentes é adicionada água ultrapura na solução até completar 1000ml, de modo que ela esteja estabilizada a 36,5°C e pH em 7,4, aferidos com um pH-metro MS TecnoPON modelo MPA 210. O fluido é então resfriado a temperatura ambiente e filtrado com filtro de seringa Merk Millipore de 0,22µm, e então armazenado em frasco plástico a temperatura entre 6 e 10°C.

Tabela 2: Reagentes utilizados na produção do SBF na ordem de dissolução [34].

Ordem	Reagente	Quantidade (g)
1	NaCl	8,035
2	NaHCO ₃	0,355
3	KCl	0,225
4	K ₂ HPO ₄ 3H ₂ O	0,231
5	MgCl ₂ 6H ₂ O	0,311
6	1.0M-HCl	39ml
7	CaCl ₂ 2H ₂ O	0,387
8	Na ₂ SO ₄	0,072
9	Tris	6,118
10	1.0M-HCl	0-5ml

Com o SBF preparado, as amostras foram colocadas em imersão no SBF em tubos plásticos do tipo Falcon, com capacidade de 50ml, suspensas por prendedores plásticos

segundo a proporção de 0,1ml de SBF para cada mm² de área superficial da amostra. A Figura 7 ilustra o posicionamento das amostras para imersão.

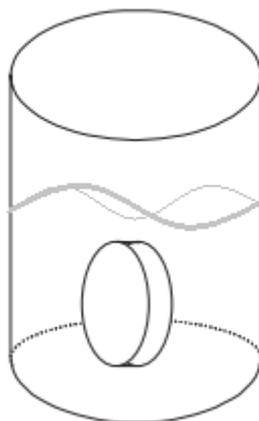


Figura 7: Ilustração da disposição da amostra em imersão em SBF. Adaptado de [34].

As amostras em imersão foram mantidas em banho térmico a 36,5°C nos períodos de 0,25, 1, 4, 7, 14, 21 e 28 dias, sendo $n = 3$ para cada período de cada um dos grupos experimentais. Após cada período de imersão as amostras foram retiradas, enxaguadas gentilmente com água ultrapura, secas em temperatura ambiente em placa Petri cobertas por papel alumínio por um dia e armazenadas em dissecadores para análises futuras.

3.9 – Avaliação de pH e perda de massa

Os valores de pH da solução pós imersão foram aferidos utilizando um pH-metro MS Tecnopon modelo MPA 210, previamente calibrado com soluções tampão de pH 4,0, 7,0 e 10,0 com precisão de $\pm 0,001$, a temperatura de 36,5°C e precisão de $\pm 0,1$, sendo uma média de 3 amostras para cada tempo de imersão, para cada grupo experimental. A perda de massa das amostras foi obtida por comparativo com a massa da amostra pré-imersão que foi aferida por uma balança analítica Shimadzu modelo UW220D com precisão de 0,1mg.

3.10 – Espectroscopia de Emissão em Plasma de Micro-Ondas (MP-AES)

As análises de concentração de íons liberado nas soluções após imersão das amostras durante cada período, foi realizada em colaboração com o Professor Dr. Marcelo Augusto Batista do Departamento de Agronomia da Universidade Estadual de Maringá

(UEM). Foi utilizado um espectrômetro de emissão em plasma de micro-ondas Agilent Technologies modelo MP-AES 4200 por meio da utilização da técnica de curva de calibração utilizando amostras padrões. Cada medida é uma média de três aquisições de 3 segundos de exposição que foram obtidas após 12 segundos de estabilização. As soluções após imersão foram previamente diluídas em água ultrapura, na proporção de 1 de amostra para 20ml de água e bombeadas utilizando uma bomba peristáltica com rotação de 15RPM. Foram obtidas as concentrações dos íons de Cálcio (Ca) e Fósforo (P), nos comprimentos de onda em: 445,478 nm e 213,618 nm, respectivamente.

3.11 – Avaliação da viabilidade celular pelo método colorimétrico MTT

A avaliação da atividade citotóxica das vitrocerâmicas foi realizada em colaboração com o Professor Dr. Celso Vataru Nakamura, Dr^a. Nilma de Souza Fernandes e a doutoranda Me. Karine Campos Nunes, do Laboratório de Inovação Tecnológica no Desenvolvimento de Fármacos e Cosméticos da Universidade Estadual de Maringá (UEM). Foram utilizadas em células de pré-osteoblásticas, da linhagem MCT3T3-E1. Para isso as células foram ressuspensas à concentração de $2,5 \times 10^5$ células/ml em meio α -MEM acrescido de 10% de SFB, adicionado 100 μ l nos poços da placa de 96 poços, e incubadas por 24h a 37°C e 5% de CO₂. Os materiais testados foram solubilizados em DMSO e diluídos em meio para as concentrações 1000, 700, 400 e 100 μ g/ml. Em seguida foram adicionados sobre a monocamada celular e incubados por 24h, nas mesmas condições. Após a incubação, foi adicionado 50 μ L de solução de MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio) à 2mg/ml. A placa foi incubada por 4 h a 37°C com 5% de CO₂ (protegido da luz) e adicionados 150 μ L de DMSO. A leitura foi realizada em leitor de microplaca BIO-TEK modelo Power Wave XS em 570 nm.

4 – RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 – Parte I – Pré-Imersão

Neste capítulo é abordado a caracterização das amostras antes de imersão em SBF, no qual são apresentadas as análises de tamanho de partícula, térmica, cristalografia, espectroscópica e morfológica das amostras.

4.1.1 – Tamanho de partícula

A análise de tamanho de partícula dos grupos experimentais ($< 62,5 \mu\text{m}$), (93,0 – 125,0 μm) e (180,0 – 250,0 μm) mostra uma distribuição de diferentes tamanhos, como notado na Figura 8. A amostra com menor tamanho de partículas apresenta partículas predominantemente entre 9 e 103 μm de tamanho, o intervalo de relevância de tamanho de partícula foi adotado de acordo com Cruz e Santos [8] sendo o intervalo que compreende 90% da maior parte distribuição de tamanho de partícula. Assim sendo, a amostra com tamanho de partículas intermediário apresenta mais partículas de tamanhos entre 60 e 201 μm com tamanho médio em torno de 119 μm obtido pelo método de ajuste de LogNormal, e por fim a amostra com maior tamanho de partícula tem predominância de tamanhos entre 118 e 342 μm e tamanho médio de 191 μm . Assim sendo, as amostras são denominadas de acordo com o intervalo de tamanho de partícula, sendo P1 abaixo de 103 μm , P2 entre 60 e 201 μm e P3 entre 118 e 342 μm . Por apresentar mais de uma concentração de tamanho de partícula, a amostra P1 teve três regiões características de tamanho de partícula, apresentando tamanho médio em 2, 6 e 75 μm .

A presença de partículas maiores após a peneiração é justificada por consequência do processo de pulverização das amostras, que consiste na quebra de partículas por meio de choques mecânicos, formando partículas de diferentes formatos de partículas que podem atravessar as peneiras a depender da disposição com que é depositada e agitada para peneiramento. Já a presença de partículas menores em meio as partículas maiores são justificada devido à forças de interação eletrostáticas que podem ser geradas durante o atrito entre as partículas tanto durante a pulverização, quanto no processo de peneiramento. Imagens obtidas via MEV das amostras peneiradas estão no anexo ao final deste trabalho exibindo as partículas em diferentes intervalos de tamanho de partícula nas Figuras A1, A2 e A3.

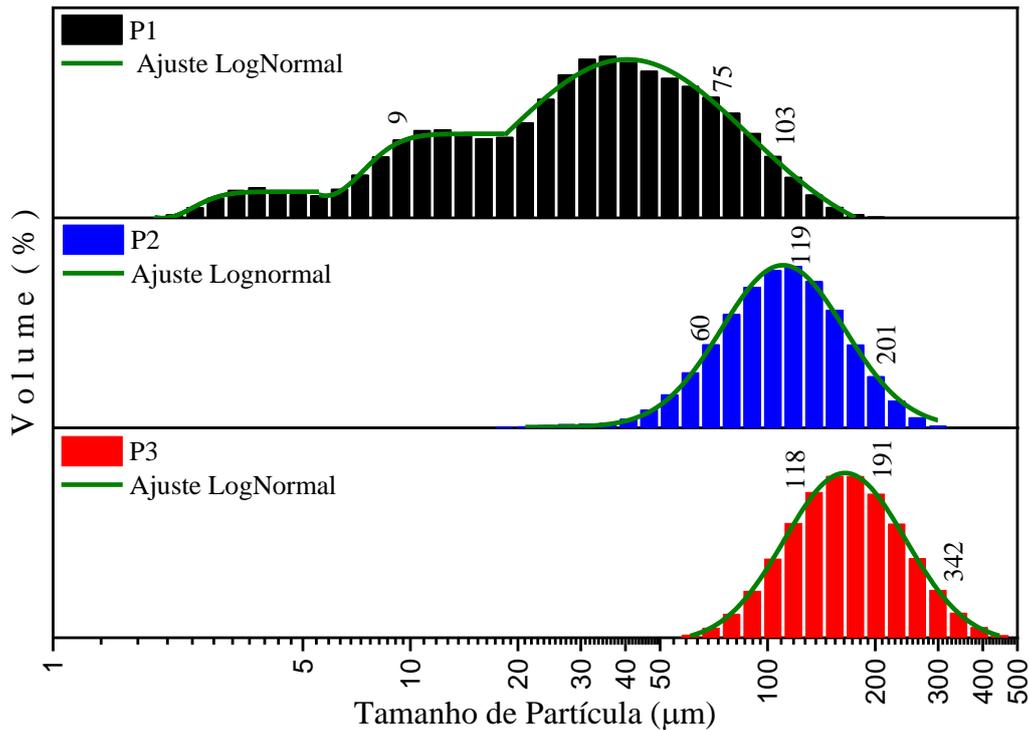


Figura 8: Distribuição de tamanho de partícula após peneiramento em peneiras de faixas de mesh conhecido, sendo: P3 entre 180 e 250 μm , P2 entre 93 e 125 μm e P1 < 62,5 μm .

Apesar das amostras apresentarem partículas de mesmo tamanho em diferentes intervalos de granulometria, devido a maior quantidade estar concentrada na faixa de tamanhos das peneiras, pode ser dito que há a diferenciação de tamanho de partícula para as amostras, sendo assim classificados nos três grupos experimentais: P1 o grupo com menor tamanho de partículas, entre 9 e 103 μm ; P2 tendo partículas entre 60 e 201 μm e P3 contendo o maior tamanho de partícula que pode variar entre 118 e 342 μm .

4.1.2 – Calorimetria exploratória diferencial (DSC)

A determinação das temperaturas características de transição de fases do material pode ser determinada por meio da utilização da técnica de DSC. Na Figura 9 são apresentadas as curvas termométricas das amostras P1, P2 e P3, em destaque as regiões onde ocorrem a transição de fase do vidro 60B5F2P para cada faixa de granulometria.

A primeira temperatura característica é transição de fase do vidro, também chamada de transição vítrea (T_G), que ocorre em aproximadamente 500°C, seguida da temperatura de início da cristalização ($T_X \sim 620^\circ\text{C}$). Após a cristalização, o vidro se encontra em estado de líquido com alta viscosidade [11]. Estas temperaturas são

característica das propriedades intrínsecas do vidro, e por isso independentemente do tamanho de partícula, o que acarreta valores de temperaturas similares para P1, P2 e P3.

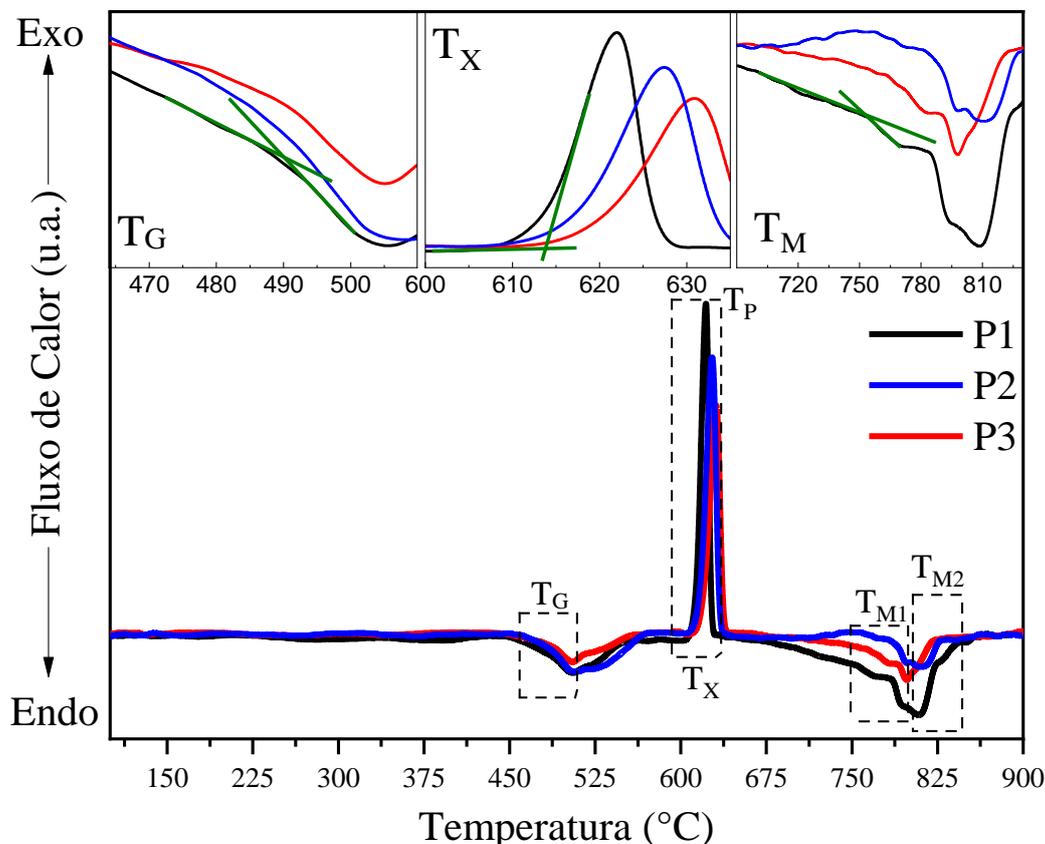


Figura 9: Termograma do vidro bioativo 60B5F2P, em pó, nas granulometrias P1, P2 e P3, sendo $P1 < P2 < P3$. Em destaque as regiões de temperaturas características de transição de fase no vidro, as linhas verdes são indicadores visuais.

Há a presença de um pico exotérmico, pico de cristalização T_P , que apresenta diferença considerável de temperatura nas três amostras. Fatores experimentais, tais como, massa das amostras, material que é feito o cadinho, rampa de aquecimento, controle de atmosfera e tamanho de partícula podem fazer com que estes picos sofram deslocamento, pois não são características intrínsecas do vidro. Todos os fatores experimentais citados anteriormente foram iguais para todas as amostras, exceto o tamanho de partícula [43, 44]. Quanto menor o tamanho de partícula, menor pode ser a sua temperatura de pico, devido à maior área superficial [43], assim como é mostrado no termograma, o vidro com menor tamanho de partícula P1, tem a menor temperatura de pico de cristalização seguido do pico de cristalização em P2 e logo após P3. Ainda é possível observar dois picos endotérmicos, caracterizados como a temperatura de fusão ou decomposição de fases cristalinas formadas no material, sendo o primeiro pico T_{M1}

seguido de T_{M2} . Materiais com dois picos de fusão tem por característica apresentar duas ou mais fases cristalinas [42 – 44]. As temperaturas obtidas por meio dos termogramas estão apresentadas na Tabela 3.

Tabela 3: Caracterização térmica do vidro bioativo 60B5F2P, em pó, com diferentes tamanhos de partículas obtidos a partir do termograma das análises de DSC. ($T_{\pm 5}$)°C e ($\Delta T_{\pm 10}$)°C.

Amostra	T_G (°C)	T_X (°C)	T_P (°C)	T_{M1} (°C)	T_{M2} (°C)	ΔT (°C)
P1	504	614	622	793	812	110
P2	502	617	627	798	809	115
P3	505	620	631	782	796	115

P1: $9 \leq d \leq 103 \mu\text{m}$; P2: $60 \leq d \leq 201 \mu\text{m}$; P3: $118 \leq d \leq 342 \mu\text{m}$; d tamanho de partícula e $\Delta T = T_X - T_G$.

A partir do termograma das amostras é possível obter a estabilidade térmica (ΔT) do vidro, este resultado corresponde a estabilidade da estrutura vítrea do vidro, que para os vidros borato deve ser maior que 70°C. A estabilidade térmica é obtida a partir da diferença $T_X - T_G$ [43]. A estabilidade térmica das amostras é em torno de 110°C, mostrando que o vidro apresenta estabilidade vítrea e conseqüentemente melhor resistência a nucleação e formação de fase cristalina, facilitando a manipulação para obtenção de vitrocerâmicas por meio de tratamento térmico [11, 42 – 44].

4.1.3 – Difratomia de Raios-X (DRX)

A caracterização estrutural das amostras é feita utilizando a técnica de DRX, a fim de identificar as fases cristalinas formadas no vidro após tratamento térmico em 715 °C (60B5F2P-715). Inicialmente foi obtido o difratograma do vidro 60B5F2P pulverizado e peneirado em cada uma das faixas de tamanho de partícula, como mostrado na Figura 10. O difratograma do vidro apresenta halos, típicos de materiais amorfos, o que determina a natureza desordenada da estrutura dos vidros, confirmando a estrutura vítrea do material antes do tratamento térmico [45]. Os difratogramas também mostram que a pulverização do vidro por meio de choque mecânico, bem como o peneiramento, não causaram reorganização estrutural do vidro, que permanece apresentando os halos amorfos independente da faixa de tamanho de partícula utilizados neste trabalho.

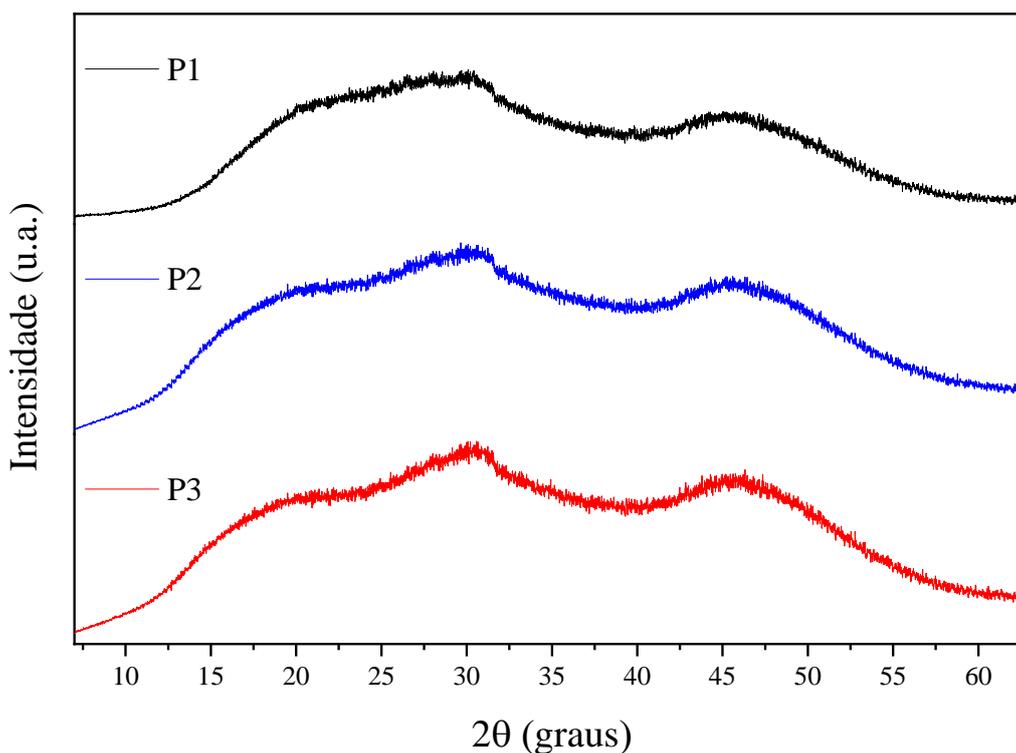


Figura 10: Difratoograma de Raios-X do vidro bioativo 60B5F2P em diferentes faixas de tamanho de partícula P1 (9 - 103 μm), P2 (60 - 201 μm) e P3 (118- 342 μm).

Os difratogramas das peças, pulverizadas, de vitrocerâmica 60B5F2P-715 com tamanhos de partícula P1, P2 e P3, estão apresentados na Figura 11, na qual se nota picos de difração bem definidos, atestando que a temperatura utilizada para o tratamento, de 715°C , induz a nucleação e a cristalização do material, essa informação atrelada as análises de DSC da amostra, afirmam que nesta temperatura o vidro se torna cristalino apresentando uma estrutura molecular organizada e periódica.

Ainda, a partir da análise dos difratogramas das amostras, é possível a indexação das fichas cristalográficas padrão, provenientes da base de dados ICDD (*International Center for Diffraction Data*) [46]. Para estimar o percentual de cada fase cristalina indexada foi utilizado o método de Razão das Intensidades de Referência, do inglês, *Reference Intensity Ratio* (RIR), baseado na avaliação da intensidade de difração da fase não caracterizada com base na difração de um material usado como referência I/I_c , na maioria das vezes o material referência é o coríndon [47].

Em estudo anterior Gibin [41], que utilizou a vitrocerâmica 60B5F2P-715 mostrou a presença de três fases cristalinas predominantes: Pentaborato de Sódio e Cálcio (CaNaB_5O_9), Pentaborato Trissódio de Cálcio ($\text{CaNa}_3\text{B}_5\text{O}_{10}$) e Fluorapatita (FA) ($\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3\text{F}$), cujas fixas cristalográficas correspondem, respectivamente, JCDPS # 078-

0294, JCDPS # 078-0295 e JCDPS # 071-0881 [40, 41]. O tratamento de matrizes vítreas a base de boro, sódio e cálcio pode apresentar polimorfismo de mais fases cristalinas [48]. No atual estudo as mesmas fases foram indexadas para três intervalos de tamanho de partícula.

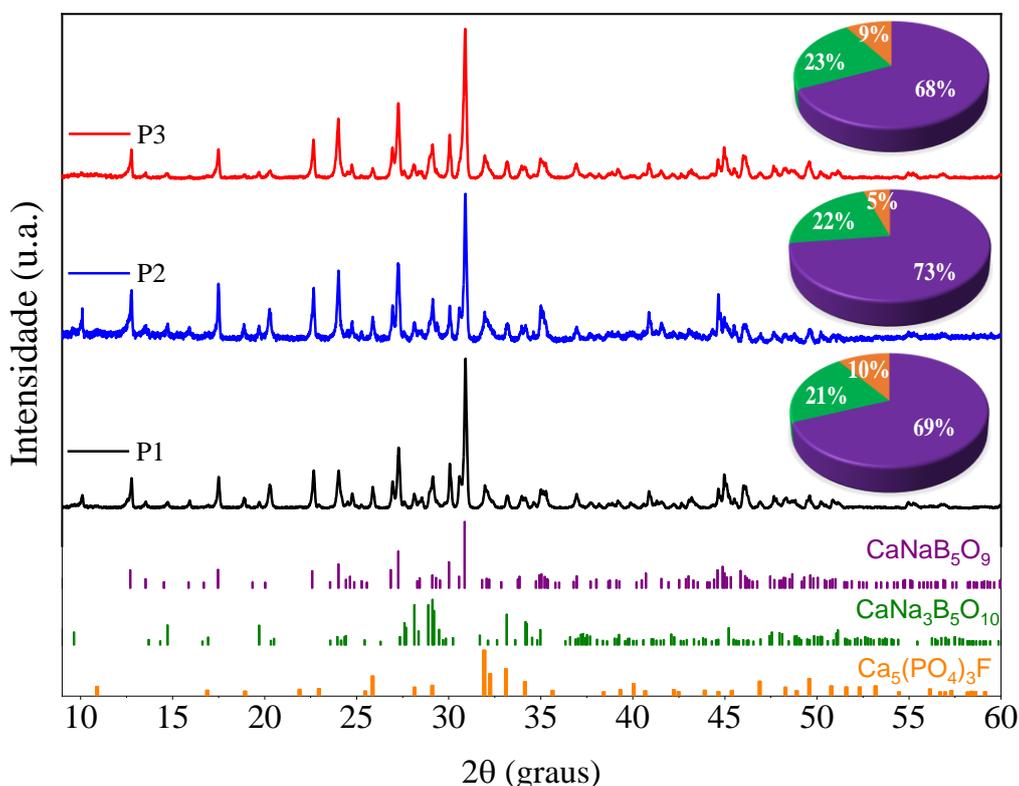


Figura 11: Difratoograma das amostras P1, P2 e P3 com indexação das fases CaNaB_5O_9 (JCDPS # 078-0294) em roxo, $\text{CaNa}_3\text{B}_5\text{O}_{10}$ (JCDPS # 078-0295) em verde e FA (JCPDS # 071-0881) em laranja. Os gráficos circulares mostram a análise semiquantitativa utilizando o método RIR.

Por meio do método RIR foi estimada a presença de 69% da fase CaNaB_5O_9 , 21% de $\text{CaNa}_3\text{B}_5\text{O}_{10}$ e 10% de $\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3\text{F}$ para P1, 73% de CaNaB_5O_9 , 22% de $\text{CaNa}_3\text{B}_5\text{O}_{10}$ e 5% de $\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3\text{F}$ para P2 e 68% de CaNaB_5O_9 , 23% de $\text{CaNa}_3\text{B}_5\text{O}_{10}$ e 9% de $\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3\text{F}$ para P3. Independente da granulometria P1, P2 e P3 apresentam as mesmas fases cristalinas, com percentuais muito próximos, indicando que diferentes tamanhos de partícula não induzem a formação de novas fases.

Mona A. e colaboradores [49] produziu vitrocerâmicas de vidros borato bioativos com diferentes proporções de óxidos em temperaturas próximas de 700°C , e mostrou a formação das fases CaNaB_5O_9 e $\text{CaNa}_3\text{B}_5\text{O}_{10}$, além das fases de $\text{B}_2\text{Ca}_2\text{O}_5$ e CaB_2O_4 e fases de fosfato de cálcio e fosfato de sódio. As fases cristalinas de fosfato foram

consideradas secundárias adicionais e oriundas da adição de pentóxido de fósforo como agente modificador de rede.

Fases cristalinas secundárias podem se converter para fases primárias a depender do tratamento térmico, Şener, S. e colaboradores [50] estudaram a decomposição de fases amorfas e cristalinas de ulexita, um mineral natural composto principalmente por boro, cálcio e sódio, em função do tratamento térmico, e observou que a fase CaNaB_5O_9 se decompõe para fase de CaB_2O_4 . Além disso, a formação da fase $\text{CaNa}_3\text{B}_5\text{O}_{10}$ surge devido à adição do pentóxido de fósforo como denotado por Yao, A. e colaboradores [51] que menciona que a quantidade dessa fase formada cresce em conjunto com a quantidade de P_2O_5 que é adicionado no material.

4.1.4 – Espectroscopia Raman

A espectroscopia Raman fornece informações de grupos químicos de materiais, desde que sejam Raman ativos, podendo ser utilizada como uma técnica de caracterização de materiais com estrutura vítrea e cristalina.

A Figura 12 apresenta os espectros Raman das amostras P1, P2 e P3 comparado ao do vidro 60B5F2P (peça). É notado que a pulverização e peneiramento do vidro não afetam suas características espectrais. Assim sendo, os dados obtidos tanto pela espectroscopia Raman quanto pela técnica de DRX e análise e caracterização térmica mostram que os tamanhos de partículas estudados neste trabalho não prejudicam a estrutura vítrea do material.

O óxido de boro em estado vítreo apresenta bandas características conhecidas, as quais são atribuídas principalmente as superestruturas do material, como metaboratos, anéis boroxol, entre outros [52, 53]. A banda mais intensa centralizada em 764 cm^{-1} é atribuída ao modo vibracional de formação do tipo abano dos anéis boroxol, assim como a banda centrada em 639 cm^{-1} , estes anéis são formados a partir de estruturas unitárias de metaborato devido à adição de óxidos modificadores na matriz do vidro [54]. Além disso, bandas relacionadas ao modo de abano simétrico de ligações de B–O em 1467, 1316 e 520 cm^{-1} são atribuídas as estruturas trigonais do boro, enquanto a banda centrada em 1096 cm^{-1} é associada a grupos diborato presentes na estrutura do material [55].

A presença do pentóxido de fósforo na matriz vítrea do vidro borato, além de otimizar a resposta bioativa do material, também é responsável pela reestruturação molecular. Saranti e Colaboradores [56] relatam o surgimento de um ombro em aproximadamente 1000 cm^{-1} devido à adição de fósforo, bem como, a banda centrada em 943 cm^{-1} que é atribuída ao modo de estiramento simétrico de P–O de unidades de ortofosfato (νPO_4). A presença do fósforo e do fluoreto de cálcio (CaF_2) no material são responsáveis pela formação de fluorapatita em vitrocerâmicas obtidas por tratamento térmico a partir da matriz vítrea utilizada neste trabalho [39, 41].

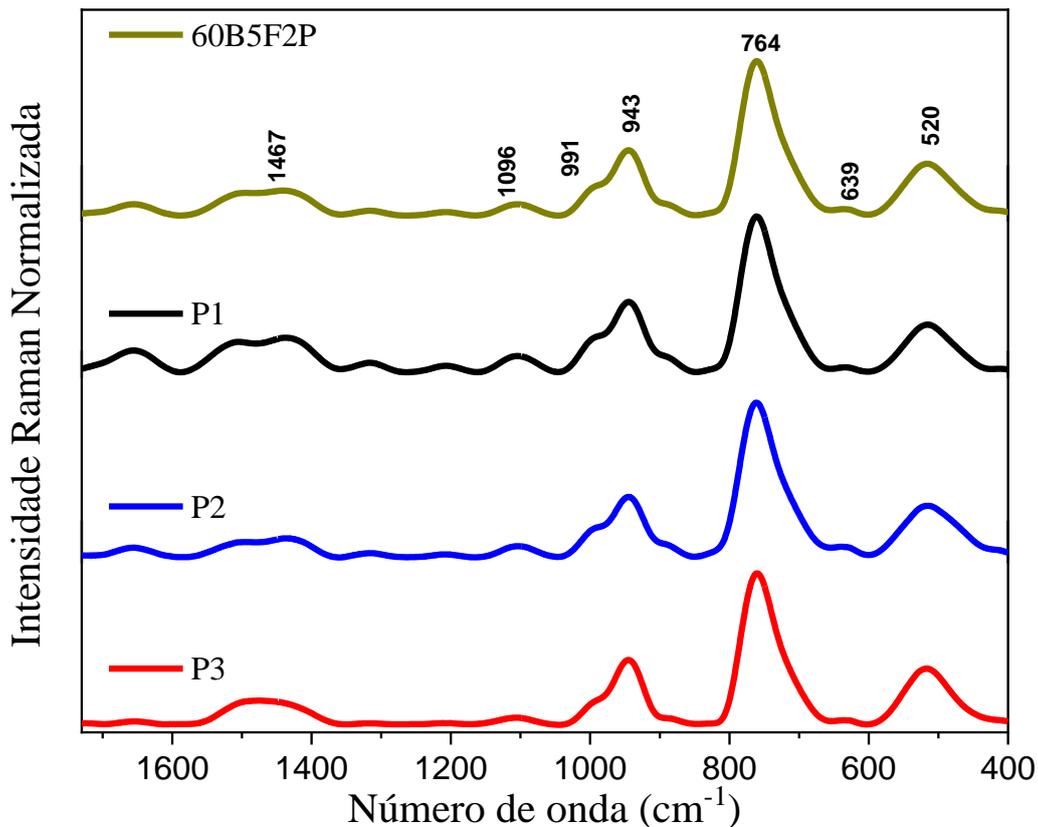


Figura 12: Espectros Raman das amostras com diferentes tamanhos de partícula P1, P2 e P3 ($P3 > P2 > P1$) e do vidro 60B5F2P (peça).

A Figura 13 apresenta os espectros do vidro após tratamento térmico a $715\text{ }^\circ\text{C}$, nos quais é notado picos bem definidos, característicos de materiais cristalinos com estruturas periódicas e organizadas. É possível observar também que não há diferenças a respeito das informações vibracionais entre as amostras produzidas da vitrocerâmica 60B5F2P-715 com diferentes tamanhos de partículas.

A partir das fases cristalinas indexadas por meio da técnica de DRX foram identificados picos característicos das mesmas fases CaNaB_5O_9 [41], $\text{CaNa}_3\text{B}_5\text{O}_{10}$ [60] e

fluorapatita RRUFF #R040098-3 [61], além da CaB_2O_4 [62], não indexada por DRX, possivelmente por ser uma fase cristalina secundária em pequenas quantidades, decorrente da degradação da fase de Pentaborato de Cálcio e Sódio [51].

As fases CaNaB_5O_9 , $\text{CaNa}_3\text{B}_5\text{O}_{10}$ e CaB_2O_4 são formadas por unidades tetraédricas e trigonais de BO que possuem modos vibracionais de estiramento e deformação em todo o intervalo espectral estudado. A banda centrada em 764 cm^{-1} no vidro é substituída por três picos bem definidos em 778 , 761 e 744 cm^{-1} associados a estiramento simétricos de B–O correspondentes a tetraboratos, e as deformações referentes a essa estrutura formada por boro são encontradas na região entre 400 e 600 cm^{-1} . As bandas centradas em 1494 , 937 e 571 cm^{-1} são atribuídas a estiramentos de B–O livre de ânions de $[\text{BO}_3]^{3-}$ [63]. Ainda, autores como Egorysheva e Jun atribuem deformações, dentro e fora do plano, as regiões entre 800 e 650 cm^{-1} e 500 e 600 cm^{-1} , respectivamente, a grupos formados por estruturas trigonais de boro, enquanto entre 859 e 960 cm^{-1} podem ser encontrados bandas associadas a estiramentos simétricos e assimétricos na região entre 1450 e 1100 cm^{-1} dessas estruturas [64, 65].

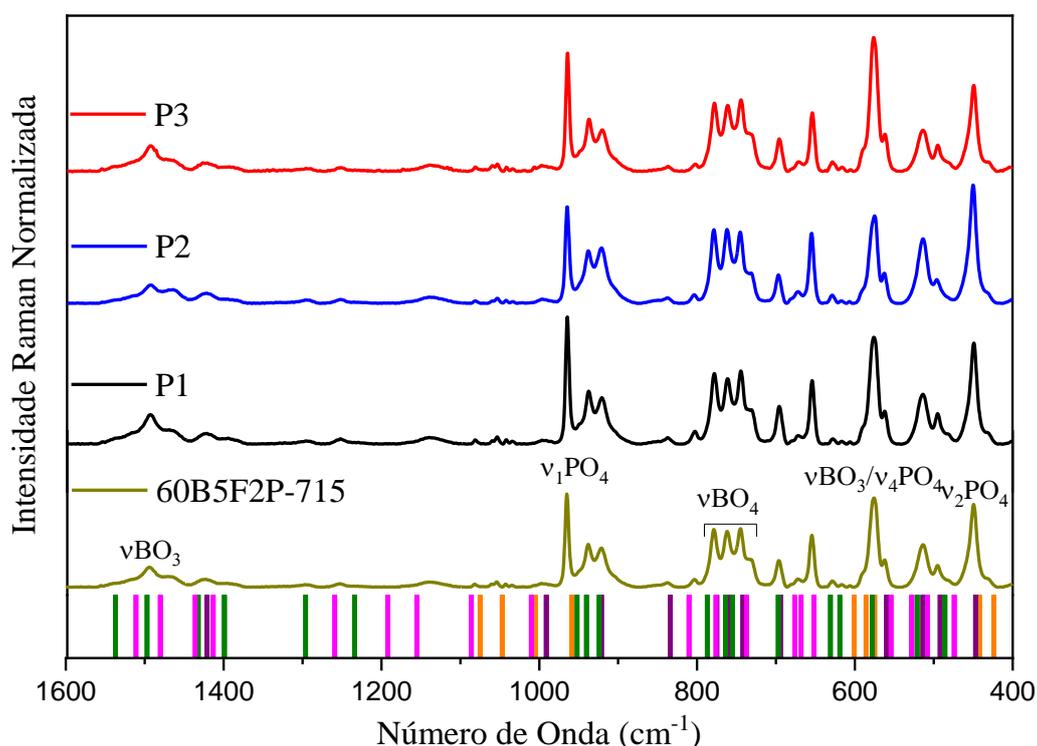


Figura 13: Espectros Raman após tratamento térmico em $715\text{ }^\circ\text{C}$ das amostras 60B5F2P, P1, P2 e P3 com a indexação das fases cristalinas: Fluorapatita (laranja) RRUFF #R40098-3[61], CaNaB_5O_9 em roxo [41], $\text{CaNa}_3\text{B}_5\text{O}_{10}$ em verde [60] e CaB_2O_4 em rosa [62].

Os picos centrados em 938 e 921 cm^{-1} são atribuídos a grupos pentaboratos [52] e em 962 cm^{-1} há um pico bem definido referente ao modo ν_1 de unidades de fosfato da fluorapatita ($\nu_1\text{PO}_4$). Já as bandas centradas entre 1100 e 1000 cm^{-1} são referentes a estiramentos assimétricos dos modos ν_3 das unidades de ortofosfato. Outros modos vibracionais relativos a fluorapatita podem estar sobrepostos por bandas associadas as estruturas formadas por boro, como o ombro formado na banda centrada em 575 cm^{-1} que se refere a grupos diborato isolados, mas também a modos vibracionais de estiramentos nos modos normais ν_4 de ortofosfato da fluorapatita que se encontram em torno de 570 cm^{-1} [57 – 59].

O uso da espectroscopia Raman como ferramenta para a caracterização da estrutura molecular das amostras foi de grande auxílio para a sustentação das análises dos difratogramas de raios-X. E empregando a espectroscopia no infravermelho pode-se expor informações complementares sobre a estrutura do material estudado[66].

4.1.5 – Espectroscopia no Infravermelho por transformada de Fourier

A Figura 14 apresenta o espectro de FTIR-ATR do vidro bioativo 60B5F2P e das amostras P1, P2 e P3 antes do tratamento térmico, na qual nota-se que o processo de pulverização por meio de choque mecânico e peneiramento não afetam a estrutura vítrea do material, tal como nas técnicas de análises anteriores.

O espectro do vidro apresenta três bandas largas (I, II e III) e um ombro na região entre 600 e 500 cm^{-1} (IV), como mostra a Figura 7. Segundo Manupriya e Colaboradores [67] a região IV aparece devido à adição de P_2O_5 à matriz vítrea que é atribuído aos modos de vibração de deformação do tipo abanos das ligações de P–O–P de grupos tetraedrais de PO_4 .

A região I que fica entre 1500 e 1200 cm^{-1} é caracterizada por estiramentos de ligações de B–O de unidades trigonais BO_3 de grupos de metaboratos [33]. Já as regiões II e III são atribuídas as unidades de BO_4 responsáveis por formar estruturas de diboratos, triboratos, tetraboratos e pentaboratos, sendo a primeira pertinente de estiramentos de ligações de B–O e a segunda associada a deformações dos modos vibracionais desses grupos [67, 68].

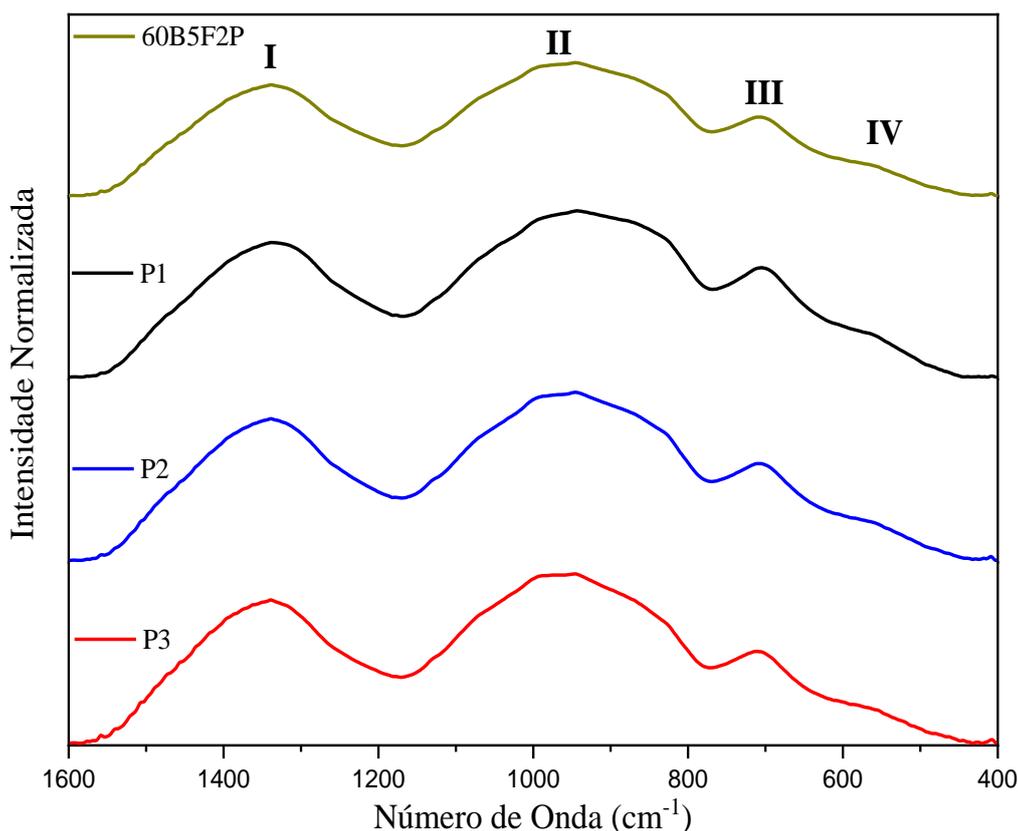


Figura 14: Espectro FTIR-ATR do vidro bioativo 60B5F2P e das amostras em diferentes tamanhos de partícula P1, P2 e P3 ($P3 > P2 > P1$).

Os espectros das amostras P1, P2 e P3 e do vidro bioativo após o tratamento térmico em 715°C são mostradas na Figura 14 novamente o processo de pulverização e peneiramento utilizados neste trabalho não ocasionou mudanças espectrais a vitrocerâmica.

A Figura 15 também mostra a indexação das fases cristalinas observadas nas técnicas de DRX e Raman: CaNaB_5O_9 em roxo [41], $\text{CaNa}_3\text{B}_5\text{O}_{10}$ em verde [60] e fluorapatita em laranja [61], além da fase CaB_2O_4 [62] em rosa, que assim como na espectroscopia Raman se mostrou presente na estrutura cristalina das amostras tratadas termicamente, apesar de não ser indexada ao DRX por ser uma fase secundária. A amostra 60B5F2P-715 apresenta picos definidos, tais como em 1385 , 1336 e 1256 cm^{-1} , região atribuída a grupos trigonais de boro com modos de vibração de estiramentos de boro e oxigênio [69].

A região entre 1200 e 800 cm^{-1} é típica das unidades de BO_4 e BO_3 com picos centrados em 943 e 1130 cm^{-1} associados a estiramentos assimétricos de B–O de grupos diboratos [63]. Ainda nessa região é possível observar bandas associadas a FA, como a centrada em 1095 cm^{-1} associada ao estiramento dos modos ν_3 dos grupos de fosfatos

[58]. A fluorapatita também apresenta picos referentes aos modos vibracionais ν_1 de P–O em 962 cm^{-1} pico que não é notado no espectro da cerâmica obtida por meio de tratamento térmico do vidro borato devido a grande presença de modos vibracionais atribuídos as formações de grupos boratos que podem ter sobreposto o pico associado a FA. Além disso a fluorapatita também apresenta picos em 603 e 561 cm^{-1} atribuídos a deformação de grupos fosfato [58].

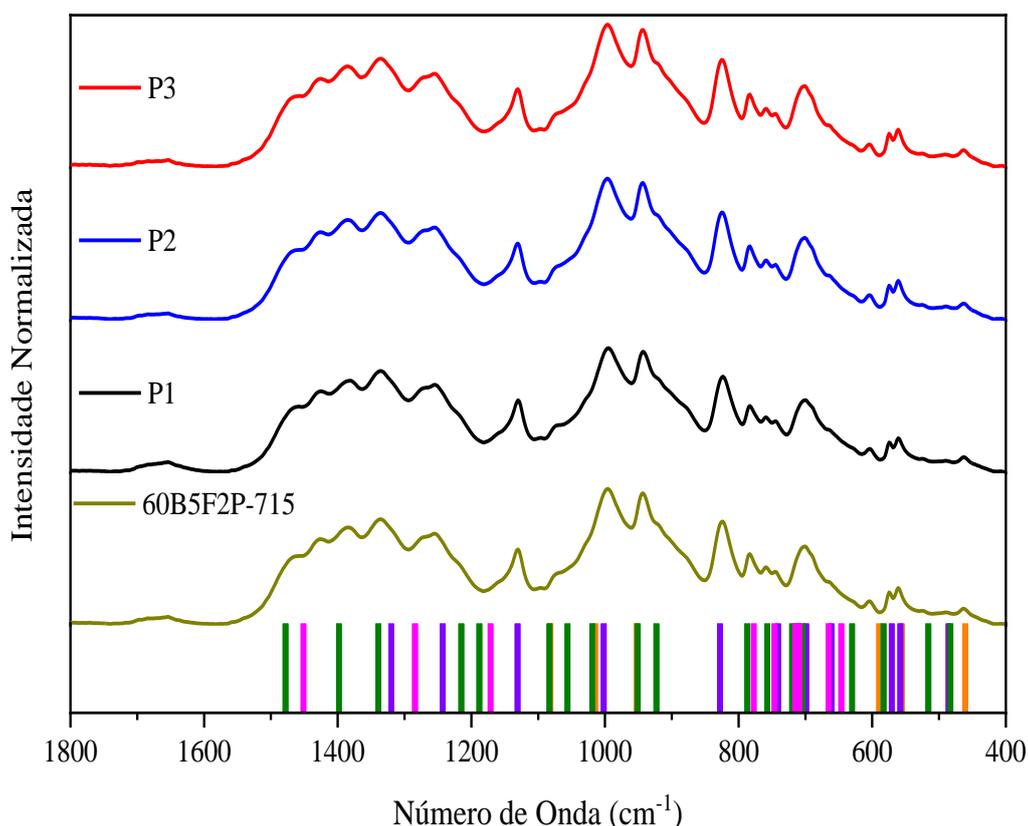


Figura 15: Espectros FTIR-ATR após tratamento térmico em $715\text{ }^{\circ}\text{C}$ das amostras 60B5F2P, P1, P2 e P3 com a indexação das fases cristalinas: Fluorapatita (laranja) RRUFF #R40098-3[61], CaNaB_5O_9 em roxo [41], $\text{CaNa}_3\text{B}_5\text{O}_{10}$ em verde [60] e CaB_2O_4 em rosa [62].

Por fim, a região III de comprimentos de onda menores que 800 cm^{-1} é predominante a presença das bandas a deformação de ligações de B–O de grupos trigonais de boratos com a adição de picos atribuídos as deformações de grupos fosfatos como já mencionado acima, que antes originava o ombro formado em torno de 550 cm^{-1} [60].

Logo, as análises por espectroscopia FTIR-ATR corroboram com as interpretações dos difratogramas de raios-X e os espectros Raman, as quais mostram que a estrutura molecular da vitrocerâmica obtida a partir do tratamento térmico do vidro borato bioativo não apresenta variações com a mudança da faixa de tamanho de partícula

utilizados neste trabalho. Para avaliar a morfologia das amostras foi realizada microscopia eletrônica de varredura, apresentada a seguir.

4.1.6 – Análise morfológica por Microscopia Eletrônica de Varredura

A fim de avaliar a morfologia das amostras P1, P2 e P3 foram obtidas as imagens de superfície e fratura do material utilizando a técnica de MEV, com diferentes ampliações das mais diversas regiões das amostras.

A Figura 16 apresenta as imagens das superfícies das amostras P1, P2 e P3 após o tratamento térmico, observa-se a formação de poros, sendo em P1 menores em comparativo com as amostras P2 e P3, porém na amostra P2 é notado uma menor quantidade de poros. Já a amostra P3 apresenta poros maiores e em grande quantidade quando comparado as superfícies de P1 e P2. A formação de poros em vitrocerâmicas segundo Mihailova e Müller [70, 71], se dá devido ao processo de cristalização do pó de vidro o que forma nos materiais com grande densidade relativa e polimorfismo de fases cristalinas.

A Figura 17 apresenta as micrografias da fratura feita nas amostras P1, P2 e P3 tratadas termicamente. Nas amostras P1 e P3 são notadas fissuras entre poros indicando interconexão entre as cavidades formadas no processo de cristalização. Já a amostra P2, apesar de apresentar porosidade, não foi observado cavidades interconectando os poros, além de exibir poros menores quando em comparação com as amostras P1 e P3. Durante o aquecimento do vidro, após ultrapassar T_G o material passa a diminuir sua viscosidade e passa a apresentar propriedades de fluido, passando a escorrer de forma bem vagarosa. A cristalização interrompe esse processo e o material fica estático, neste ponto o fluido passa para a fase cristalina e é desenvolvido o polimorfismo no material, assim como as cavidades que posteriormente são responsáveis pela formação de poros nas amostras [70].

A interconexão de poros nas amostras se assemelha a *scaffolds*, que apesar de não ser o objetivo de formar essa morfologia é um bom indicativo para a adesão de camadas apatíticas e adesão de tecidos biológicos. Além disso, é indicado que para melhor condutividade celular, crescimento ósseo e vascularização, os poros devem apresentar tamanho em cerca de 100 μ m, enquanto as interconexões podem variar em tamanho sendo necessário ao menos 40 μ m de espessura [72].

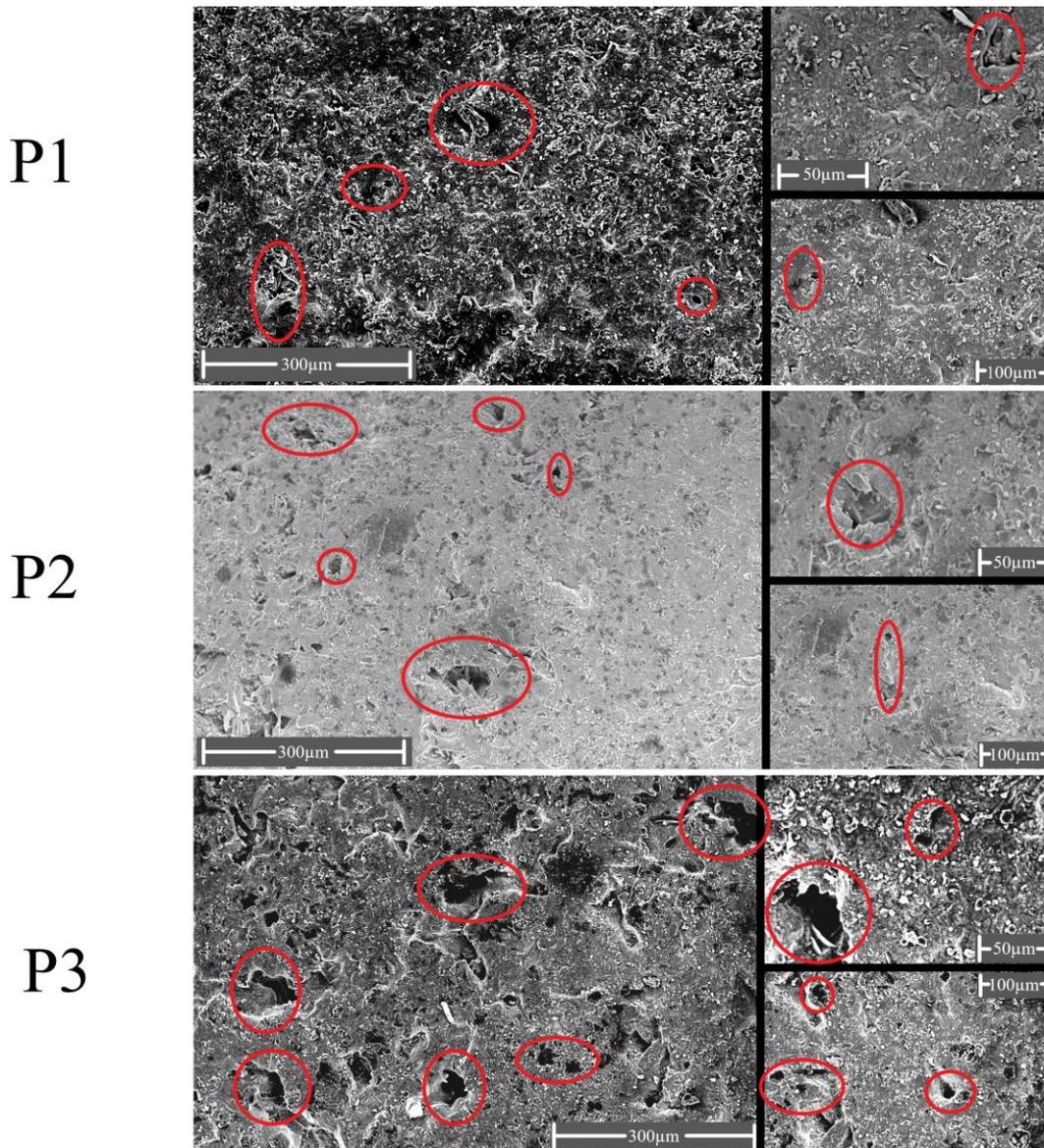


Figura 16: Micrografias das superfícies das amostras P1, P2 e P3 após o tratamento térmico em 715 °C obtidas via MEV, os círculos vermelhos são indicadores visuais.

A amostra P3 apresenta melhor essas características, como é visto na micrografia da superfície da pastilha, Figura 15, em que são notados poros que podem variar entre 150 µm a 50 µm. A amostra apresenta também boas interconexões, com tamanhos favoráveis ao crescimento celular da mesma forma que P1, apesar de superficialmente terem poros reduzidos, menores que 50 µm. Já a amostra P2 apresenta poros com cerca de 100µm, que internamente não apresentam conexão entre poros, os quais diminuem notavelmente de tamanho.

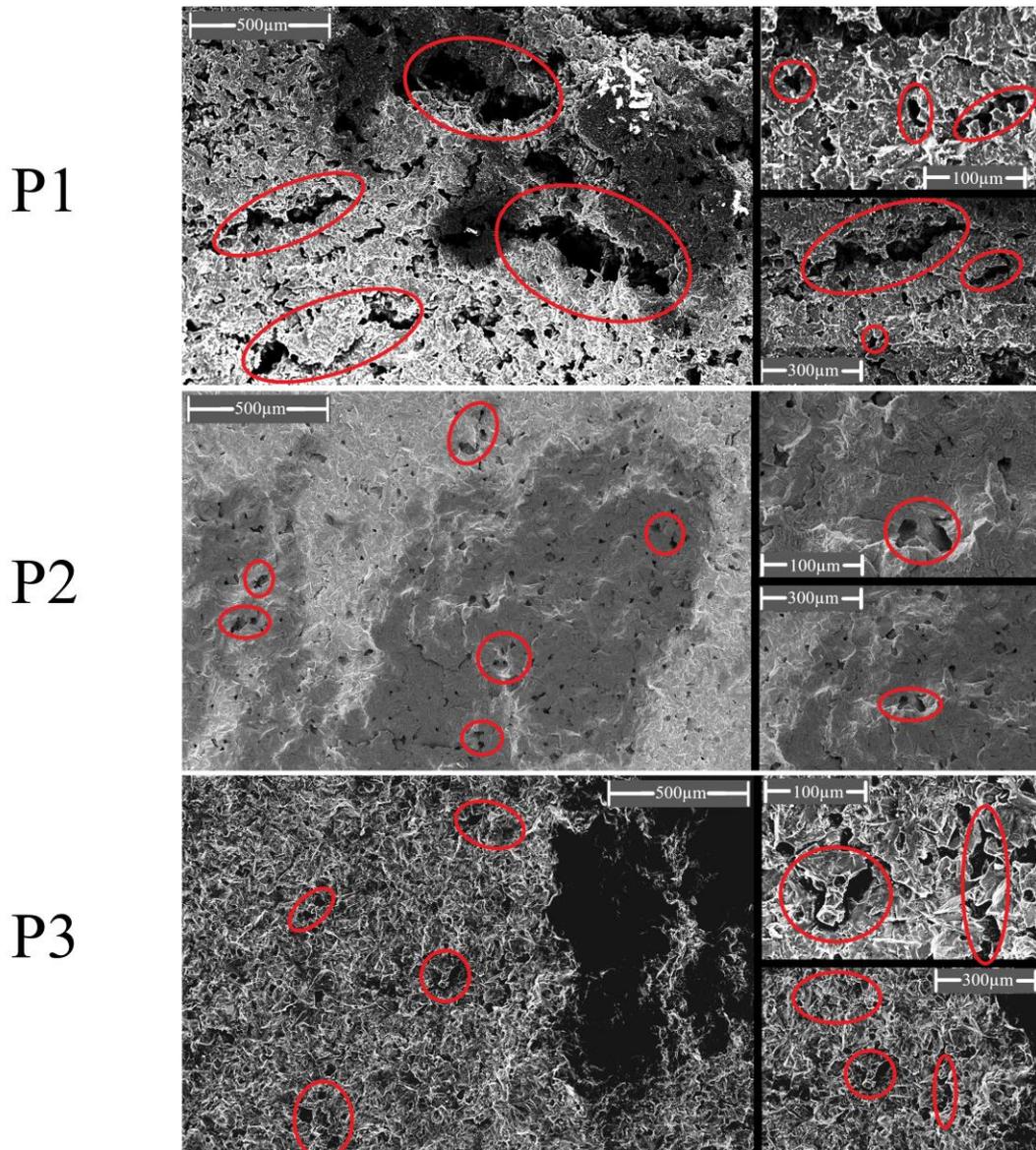


Figura 17: Micrografias das fraturas das amostras P1, P2 e P3 após o tratamento térmico em 715 °C obtidas via MEV, os círculos vermelhos são indicadores visuais.

Passando pelas análises de caracterização térmica, difratometria de raios-X, caracterização por espectroscopia Raman e FTIR-ATR, os dados se completam com a análise morfológica dos biomateriais produzidos com diferentes tamanhos de partícula. Estas análises, antes do teste de bioatividade *in vitro*, são de grande valia para o melhor entendimento de possíveis variações na bioatividade, devido a diferentes tamanhos das partículas no biomaterial.

4.2 – Parte II – Pós- Imersão em SBF

Neste capítulo são apresentados aos resultados e análises das após a imersão em SBF, por meio da avaliação de variação de pH, perda de massa, análise de íons, morfológica, cristalográfica e espectroscópica.

4.2.1 – Avaliação de pH, perda de massa e análise de íons

O processo de formação de camadas apatíticas em materiais bioativos consiste principalmente na liberação de íons provenientes da amostra em meios biológicos, podendo esses meios serem simulados, *in vitro*, ou *in vivo*, ocasionando a degradação do material que posteriormente é substituído por uma camada superficial de fosfato de cálcio. A liberação de íons provoca a degradação do material, o que pode levar a perda de massa da amostra além do aumento do pH da solução. As Figuras 18A e 18B, mostram a variação de pH e o percentual de perda de massa, respectivamente, em função do tempo de imersão em SBF para as amostras P1, P2 e P3. Já nos primeiros dias de imersão nota-se um aumento nos valores de pH para as três amostras atingindo estabilidade a partir de 7 dias de imersão. O mesmo comportamento é notado na perda de massa para as três amostras.

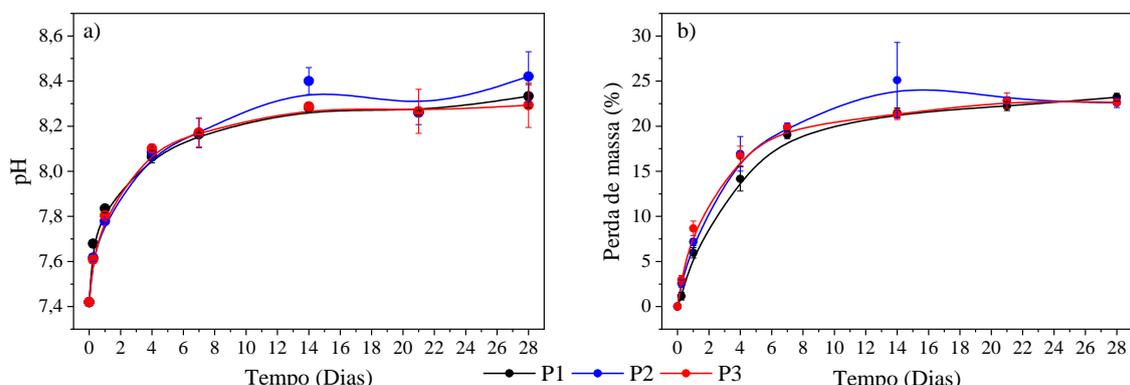


Figura 18: Variação do pH da solução de imersão (A) e do percentual da perda de massa (B) em função do tempo de imersão para as amostras P1, P2 e P3.

As Figuras 19A e 19B mostram as variações dos íons Ca e P, respectivamente, em função do tempo de imersão nas amostras P1, P2 e P3. É possível observar uma tendência de aumento para o Ca e uma diminuição para o P. Estes dois elementos são essenciais para a formação da camada de fosfato de cálcio sobre a superfície dos vidros bioativos.

O aumento do pH está correlacionado a liberação de íons para o meio de imersão, decorrente da lixiviação da superfície do biomaterial, assim provocando a dissociação de íons de sua estrutura, tais como cálcio, sódio e flúor. O cálcio e o fósforo são íons que participam da formação de camada apatítica sobre a superfície do material, por meio das trocas iônicas do biomaterial com o meio de imersão.

As amostras P1, P2 e P3 apresentam, de modo geral, comportamentos similares com relação as variações de pH e concentração dos íons de P e Ca na solução de imersão, bem como para perda de massa ao longo do período de imersão. As amostras apresentaram estabilidade de pH e perda de massa após 7 dias de imersão, e a concentração de íons de fósforo, Figura 19B, diminui com o tempo de imersão sugerindo que a troca iônica entre as amostras e o fluido ocorre de forma com que a dissociação da cerâmica bioativa é substituída pela camada apatítica, justificando a estabilidade da perda de massa da amostra.

A amostra P2 apresenta maiores valores para perda de massa e pH em 14 dias que é justificada pela liberação de íons de cálcio, Figura 19A.

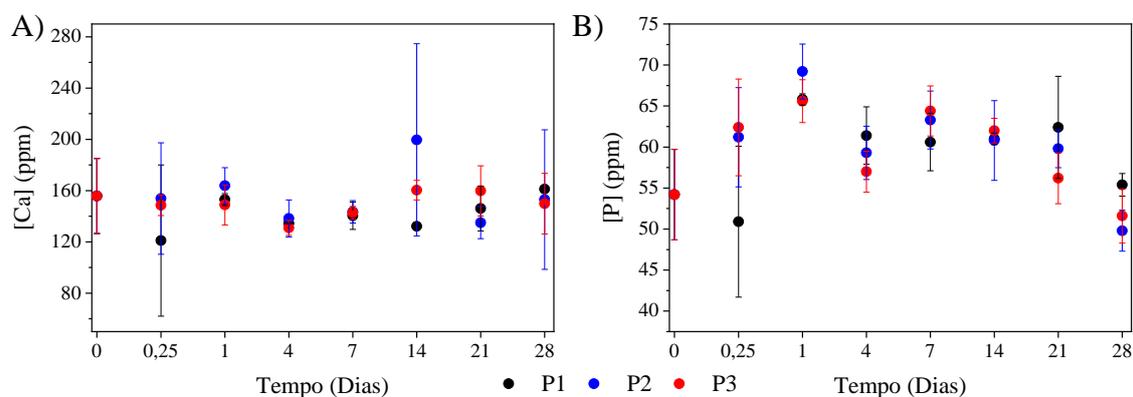


Figura 19: Concentração de íons de A) Calcio (Ca); B) Fósforo (P); na solução em função do tempo de imersão das amostras P1, P2 e P3.

4.2.2 – MEV e EDS

A formação da camada apatítica nas amostras também pode ser evidenciada por meio da análise de EDS nas superfícies das amostras, podendo ser estimada a razão Ca/P, por meio da concentração, em massa, dos íons Ca e P identificados pela técnica, é notado pela Figura 20 que a razão Ca/P diminui em função do tempo de imersão, relacionando a diminuição de íons de fosforo e estabilidade de íons de cálcio no fluido com a formação de camada no material, assim, o aumento de fósforo na superfície das amostras forma a

camada apatítica por meio da migração de fósforo do fluido para a amostra se ligando aos íons de cálcio formando fosfatos de cálcio. Com exceção da amostra P2 que apresenta estabilidade da razão Ca/P justificada pelo aumento da concentração de íons de cálcio no fluido, Figura 19A.

A razão Ca/P é também um parâmetro para avaliação de formação de camada de ACP, indicando biocompatibilidade, absorção e interação com o meio biológico do material. É esperado que a razão Ca/P das amostras após imersão fique entre 1,2 e 2,2 valor que equivale a razão do composto biológico de fosfato de cálcio amorfo (ACP), que na sua forma cristalina apresenta 1,67 de Ca/P, neste estado a camada ganha o nome de hidroxiapatita (HA) [73, 74]. As amostras P1 e P2 passam a apresentar estabilidade dos valores ideais a partir de 14 dias de imersão indicando uma rápida interação com o meio. Enquanto a amostra P3 apresenta valores correspondentes as de ACP a partir de 21 dias de imersão, esse comportamento pode ser justificado devido a amostra P3 apresentar maior interconexão entre os poros, como discutido anteriormente na seção de análises morfológica das amostras antes de imersão em SBF, aumentando a superfície de contato da amostra com o fluido e por consequência maior interação e troca iônica com o meio. Valores fora da região característica da ACP sugerem dinâmicas diferentes de formação de camada para as amostras durante o período de imersão, podendo ser necessário diferentes tempos para a nucleação e estabilização de crescimento de camadas apatíticas nas amostras, podendo apresentar instabilidade nos primeiros períodos justificado pela intensa troca iônica que ocorre nos primeiros dias de imersão conforme mostram as análises de mudanças de pH e perda de massa anteriormente discutidas.

A Figura 21 exibe as imagens obtidas via MEV das superfícies das amostras P1, P2 e P3 pós imersão em SBF. A partir do primeiro período de imersão já são notadas mudanças morfológicas nas superfícies das amostras, como a formação de rachaduras, indicando o início da precipitação e mineralização da camada apatítica, a qual evolui com o decorrer do tempo em imersão [75, 76]. As imagens mostram regiões não cobertas pelas rachaduras até 7 dias de imersão como destacado pelas setas na Figura 21, indicando o progresso do crescimento da camada nas três amostras.

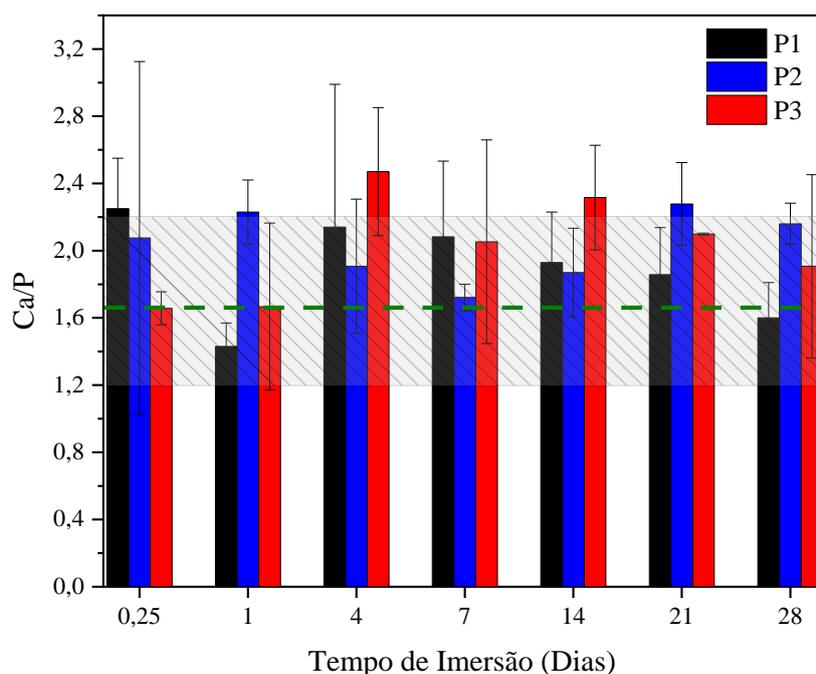


Figura 20: Razão Ca/P das amostras P1, P2 e P3 em função do tempo de imersão obtidas a partir da análise de EDS. A faixa hachurada indica a região a qual o valor da razão Ca/P correspondente aos valores da razão do composto ACP.

A partir de 14 dias as amostras estão completamente cobertas pelas rachaduras apontando que as interações superficiais com o fluido atingem um regime de saturação a partir desse período de imersão. A partir deste mesmo período foi observado, por meio das análises das curvas de pH e perda de massa um regime de estabilização, comprovando que a formação superficial da camada de fosfato de cálcio depende das trocas iônicas entre o meio de imersão e as amostras.

Excepcionalmente, a amostra P2 após 14 dias de imersão mostra poucas regiões com rachaduras, mostrando que a camada antes aderida a amostra nos primeiros períodos de imersão foi perdida, levantando a hipótese que a mesma tenha se desprendido da amostra e se dispersado no fluido, o que acarretou no aumento de pH e perda de massa da amostra, bem como, a tendência de aumento de íons de cálcio nesse período como apresentado na seção anterior. Voltando a apresentar nucleações e rachaduras na superfície a partir de 21 dias de imersão, assim como nas amostras P1 e P3, demonstrando estabilidade a partir desse período.

A morfologia das fraturas das amostras após imersão é exibida na Figura 22, a amostra P1 passa a exibir precipitação na parte interna do material após 7 dias de imersão, a partir desse período é notado crescimento de camadas apatíticas internas na amostra,

que passa a apresentar rachaduras características de formação de camadas. Do mesmo modo a amostra P2 apresenta as mesmas características a partir de 14 dias de imersão, indicando que a porosidade e interconexão dos poros das amostras influenciam na dinâmica de formação de camada no interior das amostras.

A amostra P3 passa a apresentar precipitação de fosfato de cálcio a partir de 4 dias de imersão, indicando maior abertura e interconexão entre os poros, o que permite maior permeação do fluido na amostra, aumentando a interação, justificando a razão Ca/P desta amostra ser mais elevado para os primeiros dias de imersão. Porém, assim como as amostras P1 e P2, a amostra P3 após os 28 dias de imersão tem as mesmas características da superfície das demais, indicando que a interconexão porosa das amostras possibilita maior interação com o meio e consequentemente podendo ser absorvidas ou até mesmo substituídas pelos tecidos da matriz a qual está submetido.

As análises das micrografias das amostras mostram que após a imersão em SBF as amostras apresentam boa interconexão entre poros, o que colabora para a adesão das amostras em tecidos biológicos, além de apontar a conversão da amostra em ACP, comprovando resposta bioativa positiva das amostras. A amostra P3, por apresentar maior interconexão porosa, pode ser classificada morfologicamente como ideal para aplicações diretas devido ao processo capilar expressivamente curto quando em comparação com as outras amostras, seguida da amostra P1 e por último a amostras P2, que apresentou estrutura rígida e grande adesão entre as partículas, consequentemente, porosidade mais fechada, dificultando a permeação do fluido acarretando uma interação interna mais atrasada. Em seguida é apresentado a análise da estrutura molecular das amostras após imersão em SBF utilizando as técnicas de DRX, espectroscopia no infravermelho e Raman e a viabilidade celular das amostras.

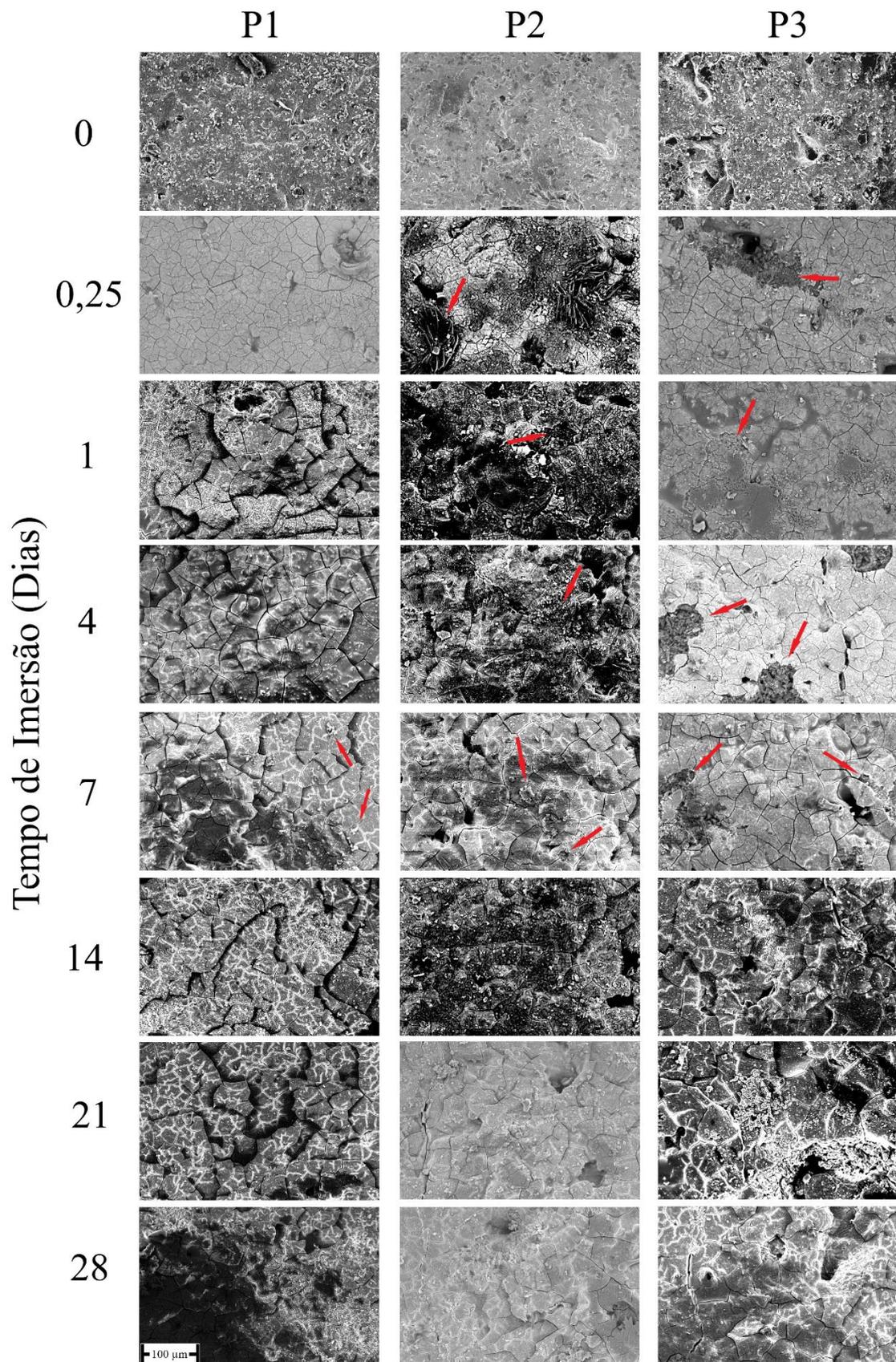


Figura 21: Micrografias das superfícies das amostras P1, P2 e P3 em função do tempo de imersão em SBF. As setas vermelhas são indicadores visuais mostrando o início de formação de camada na superfície das amostras.

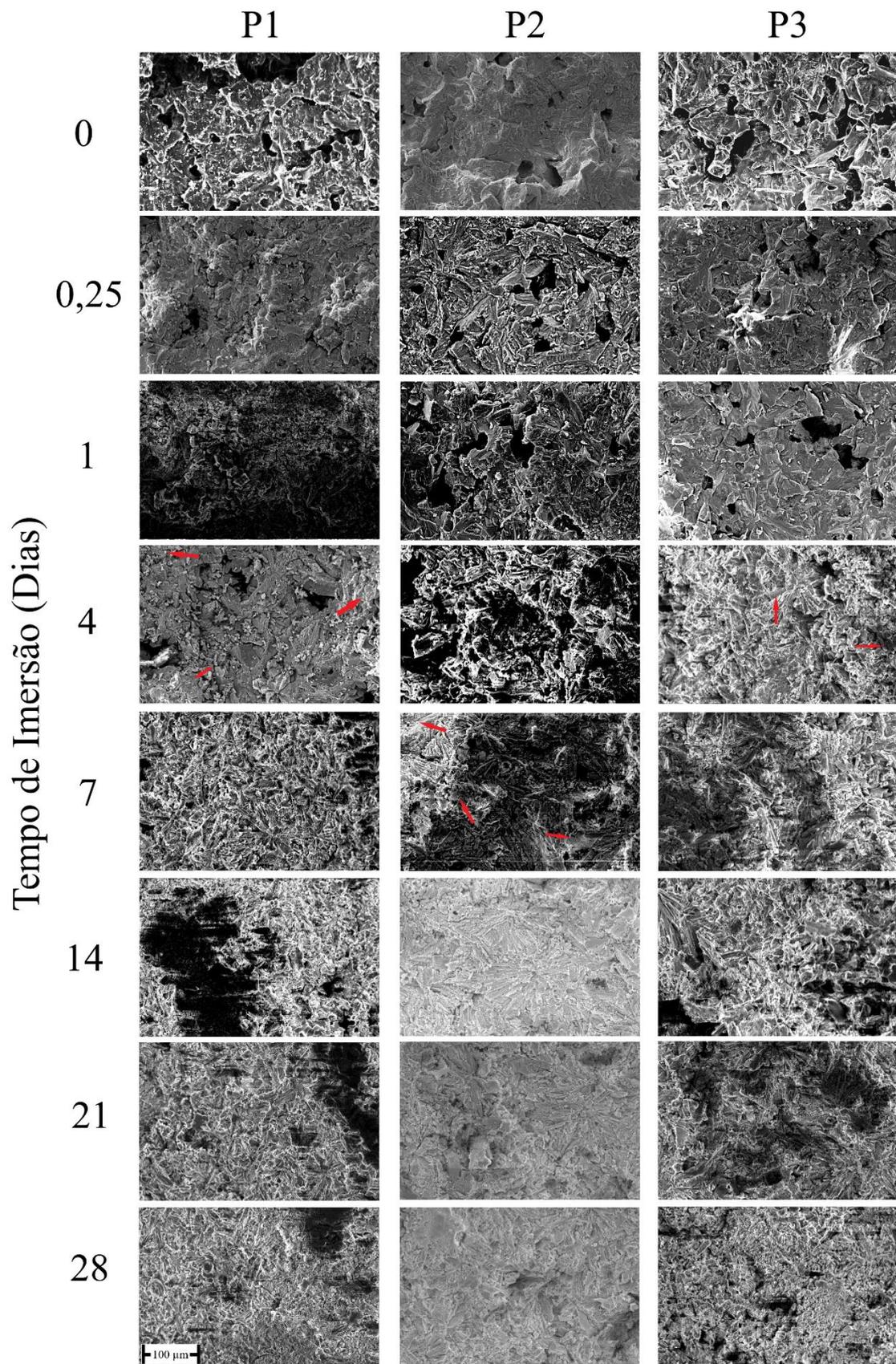


Figura 22: Micrografia das fraturas das amostras P1, P2 e P3 em função do tempo de imersão em SBF. As setas vermelhas são indicadores visuais mostrando as formações de camadas apatíticas no interior das amostras.

4.2.3 – DRX

A camada formada sobre a superfície das amostras P1, P2 e P3, após todos os períodos das peças em imersão em SBF, também foram avaliadas por meio das técnicas de DRX e espectroscopia Raman e FTIR.

Na técnica de DRX foi raspada a camada mais superficial de todas as amostras, deste modo minimizando a contribuição da vitrocerâmica sob a camada, e então obtidos os difratogramas das amostras P1, P2 e P3 e as indexações das fases cristalinas CaNaB_5O_9 , $\text{CaNa}_3\text{B}_5\text{O}_{10}$ e FA que estão mostradas nas Figuras A4, A5 e A6, respectivamente no apêndice A. Estas fases foram as mesmas indexadas nas amostras sem imersão em SBF, mostrando que a produção dos biomateriais com diferentes granulometrias não altera sua composição. Utilizando o método RIR foi feita a análise semiquantitativa das fases encontradas nos difratogramas, na Figura 23 é exibido o percentual de cada fase cristalina em função do tempo de imersão.

A fase CaNaB_5O_9 se mostrou presente nas amostras em maior quantidade, em todos os intervalos de tamanho de partícula e em praticamente, todos os períodos de imersão, já as fases $\text{CaNa}_3\text{B}_5\text{O}_{10}$ e Fluorapatita apresentam uma tendência de diminuição em função do tempo de imersão, isso ocorre devido estas fases serem mais solúveis em meios aquosos, assim a amostra após imersão passam a apresentar maiores quantidades da fase CaNaB_5O_9 [77, 78].

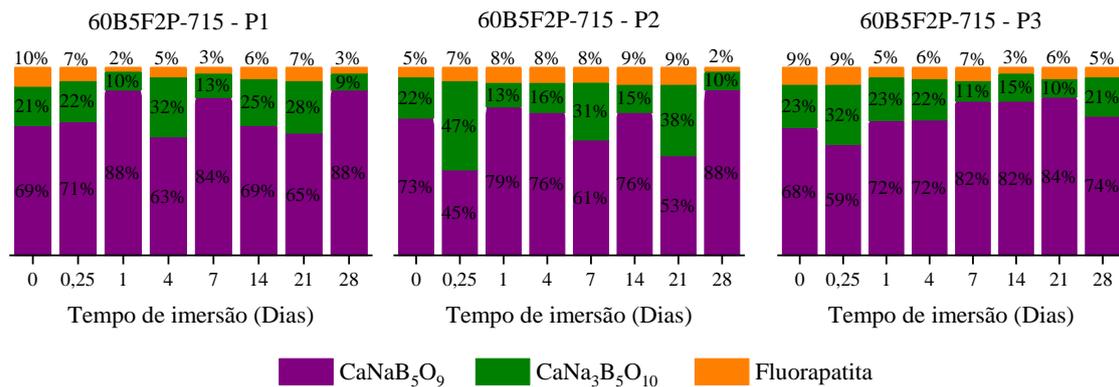


Figura 23: Quantidades das fases A) CaNaB_5O_9 ; B) $\text{CaNa}_3\text{B}_5\text{O}_{10}$ e C) Fluorapatita em função do tempo de imersão obtida pelo método RIR.

4.2.4 – Espectroscopia Raman

As medidas com a espectroscopia Raman foram realizadas na peça inteira, sem a necessidade de raspar a camada superficial, uma vez que o equipamento é equipado com

um microscópio confocal. Os espectros Raman de todos os tempos de imersão em SBF para as amostras P1, P2 e P3, com a indexação das fases cristalinas estão mostrados na Figura 24. Foi possível indexar as mesmas fases cristalinas observadas por meio da técnica de DRX, além da fase CaB_2O_4 .

É notado que as bandas antes associadas a ânions livres de $[\text{BO}_3]^{3-}$ [62, 63], centradas em 1494, 937, 803 e 571 cm^{-1} , apresentam redução em intensidade no período avaliado, evidenciando novamente a maior solubilidade das fases cristalinas com boro em SBF, tal como visto por meio das análises de DRX. As bandas em 1494, 937 e 571 cm^{-1} foram indexadas como pertencentes a fase $\text{CaNa}_3\text{B}_5\text{O}_{10}$ [60] e em 803 cm^{-1} da fase CaB_2O_4 [62], além dos ombros em 1510 e 1480 cm^{-1} . Apesar de algumas sobreposições de bandas fase CaNaB_5O_9 [41] com as demais fases presentes nas amostras, é possível observar que as bandas centradas em 923, 779, 764, 743, 696, 65, 562, 514, 493 e 448 cm^{-1} atribuídas a esta fase não apresentam variações espectrais significativas. Estes resultados indicam que a fase CaNaB_5O_9 é menos solúvel que as fases $\text{CaNa}_3\text{B}_5\text{O}_{10}$ e CaB_2O_4 , e por isso em maior quantidade, conforme os resultados pelo método RIR obtido por meio da técnica de DRX. A fase Fluorapatita é evidenciada pela banda $\nu_1\text{PO}_4^{3-}$ em 965 cm^{-1} [61]. Na Figura 8 estão destacadas as bandas das fases $\text{CaNa}_3\text{B}_5\text{O}_{10}$ e CaB_2O_4 que diminuem em função do tempo de imersão. As Figura 25, 26 e 27, para as amostras P1, P2 e P3, respectivamente, mostram ampliações das regiões com mudanças espectrais que evidenciam as alterações supracitadas para melhor visualização.

A fase $\text{CaNa}_3\text{B}_5\text{O}_{10}$, a qual é estruturada por anéis de seis membros formados por unidades trigonais de BO_3 ligados por grupos tetraedrais de BO_4 [79], e a fase CaB_2O_4 constituída por uma rede tridimensional infinita de unidades de BO_3 [80], sendo uma fase cristalina secundária, possivelmente em percentual baixo, e por isso não indexada nos difratograma. Segundo Marzouk e colaboradores, fases de boro contendo unidades de BO_3 em abundância tendem a serem mais solúveis em meios aquosos [77]. Ainda, é possível observar a formação de um ombro em 581 cm^{-1} que antes era sobreposto pela banda centrada em 571 cm^{-1} atribuída as ligações de unidades trigonais de borato que foram solubilizadas no meio de imersão este ombro pode ser associado aos modos vibracionais ν_4 da Fluorapatita [57].

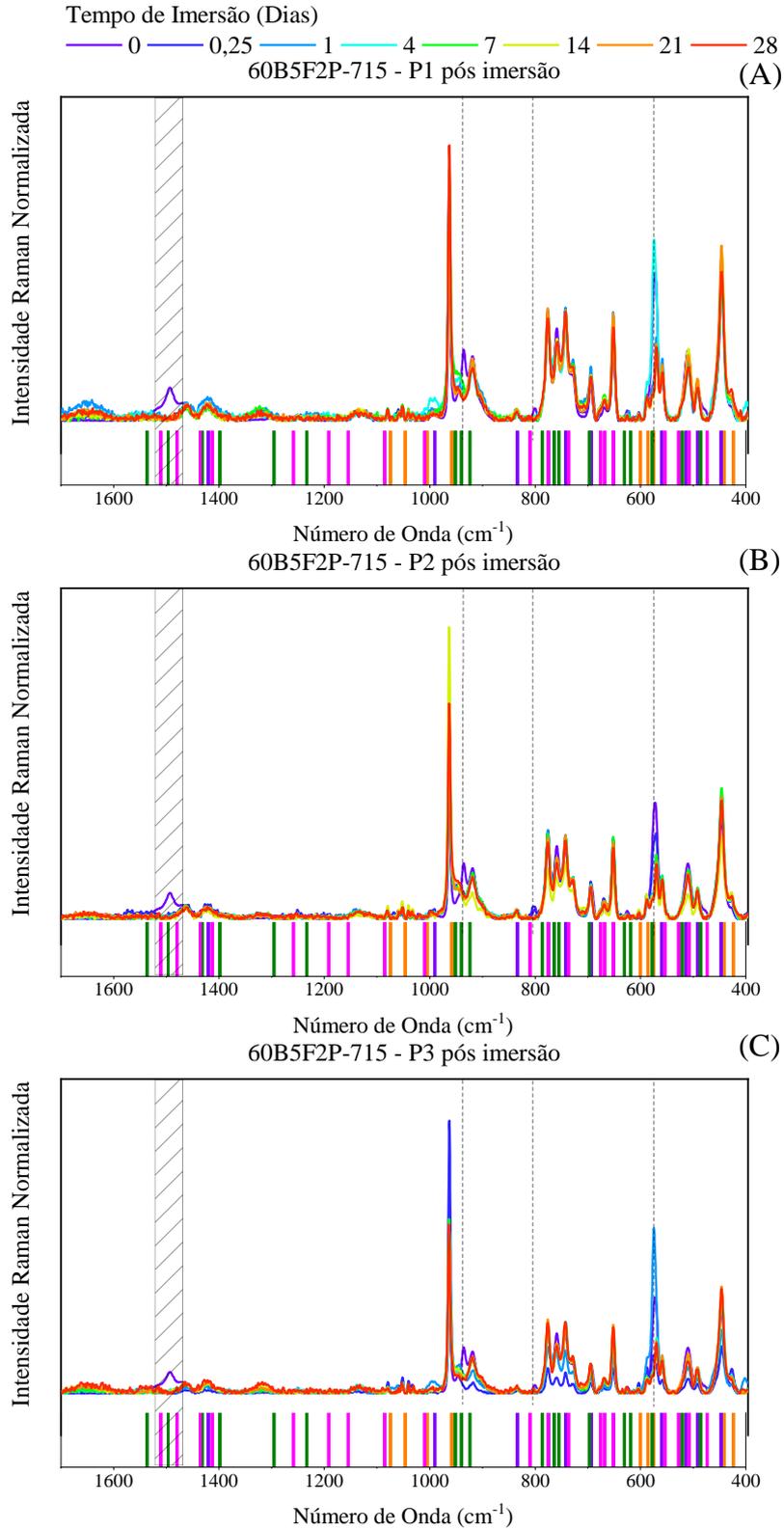


Figura 24: Espectros Raman das amostras (A) P1, (B) P2 e (C) P3 nos períodos 0, 0,25, 1, 4, 7, 14, 21 e 28 dias de imersão com a indexação das fases cristalinas: Fluorapatita (laranja) RRUFF #R40098-3[61],

CaNaB₅O₉ em roxo [41], CaNa₃B₅O₁₀ em verde [60] e CaB₂O₄ em rosa [62]. As linhas tracejadas e hachuradas destacam as mudanças espectrais nas fases CaNa₃B₅O₁₀ e CaB₂O₄; t = 0 indica a amostra sem imersão em SBF.

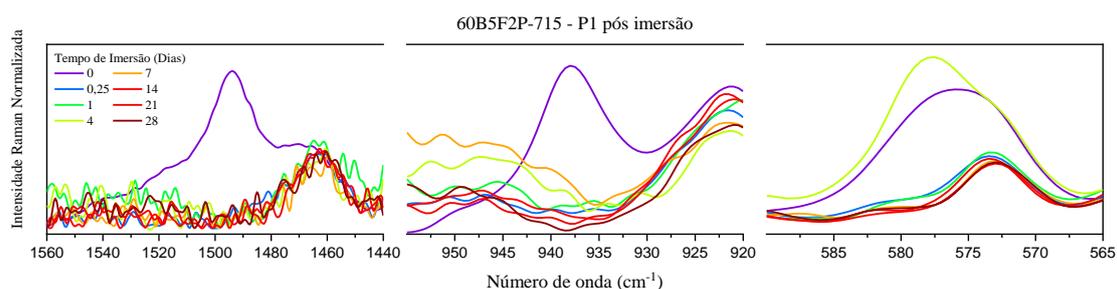


Figura 25: Espectros Raman da amostra P1 nos períodos 0, 0,25, 1, 4, 7, 14, 21 e 28 dias de imersão destacando os picos atribuídos as unidades trigonais de BO_3 .

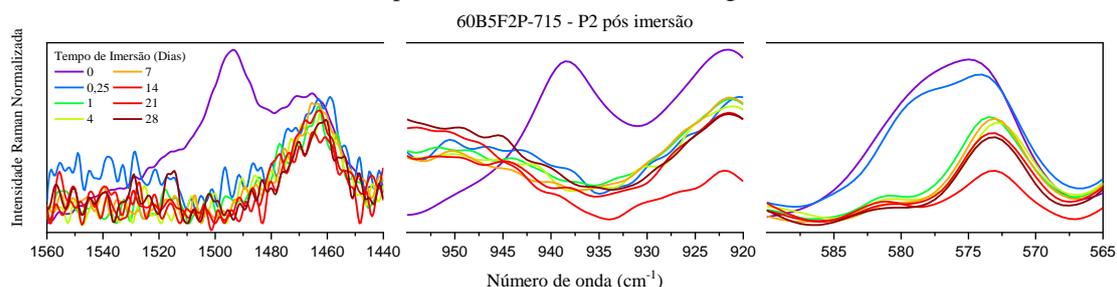


Figura 26: Espectros Raman da amostra P2 nos períodos 0, 0,25, 1, 4, 7, 14, 21 e 28 dias de imersão destacando os picos atribuídos as unidades trigonais de BO_3 .

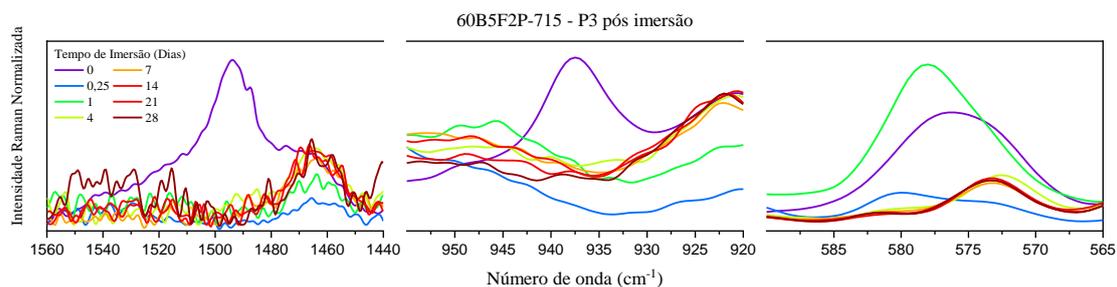


Figura 27: Espectros Raman da amostra P3 nos períodos 0, 0,25, 1, 4, 7, 14, 21 e 28 dias de imersão destacando os picos atribuídos as unidades trigonais de BO_3 .

4.2.5 – Espectroscopia FTIR-ATR

Para as análises via espectroscopia FTIR-ATR foi utilizada a camada formada sobre a superfície de cada uma das amostras, em todos os tempos de imersão em SBF. A Figura 28 mostra os espectros de FTIR-ATR e as indexações das fases cristalinas observadas. Foi possível indexar as mesmas fases cristalinas obtidas por meio da espectroscopia Raman.

Nota-se redução já em 0,25 dias das bandas centradas em 1384, 1425 e 1461 cm^{-1} , atribuídas as fases $\text{CaNa}_3\text{B}_5\text{O}_{10}$ e CaB_2O_4 [60, 61], além do deslocamento da banda centrada em 1336 cm^{-1} para números de onda menores, área hachurada e asterisco na

Figura 11, antes indexada a fase $\text{CaNa}_3\text{B}_5\text{O}_{10}$ e agora atribuída a fase CaNaB_5O_9 , devido a dissolução das unidades trigonais no meio de imersão [41].

É notado, também, que a banda centrada em 1131 cm^{-1} , indexada a fase CaNaB_5O_9 e associada a estiramentos de pontes de B–O, diminui intensidade já a partir do primeiro período de imersão. A fase de cálcio sódio pentaborato é constituída por dois anéis compostos por unidades triangulares BO_3 ligados por uma unidade tetraédrica BO_4 . Esta unidade se propaga por cadeias infinitas na direção e pelo compartilhamento das pontes de B–O [81].

As técnicas de DRX, espectroscopia Raman e FTIR-ATR forneceram informações a respeito do comportamento das fases cristalinas presentes na vitrocerâmica após imersão de 28 dias em SBF, mostrando que as fases de borato, principalmente $\text{CaNa}_3\text{B}_5\text{O}_{10}$ e CaB_2O_4 são mais solúveis em SBF. Não foram observadas mudanças significativas com relação a fase Fluorapatita. Estes resultados foram obtidos para as amostras P1, P2 e P3 indicando que a produção do biomaterial com diferentes tamanhos de partícula não altera sua composição, e assim não influencia diretamente em sua bioatividade.

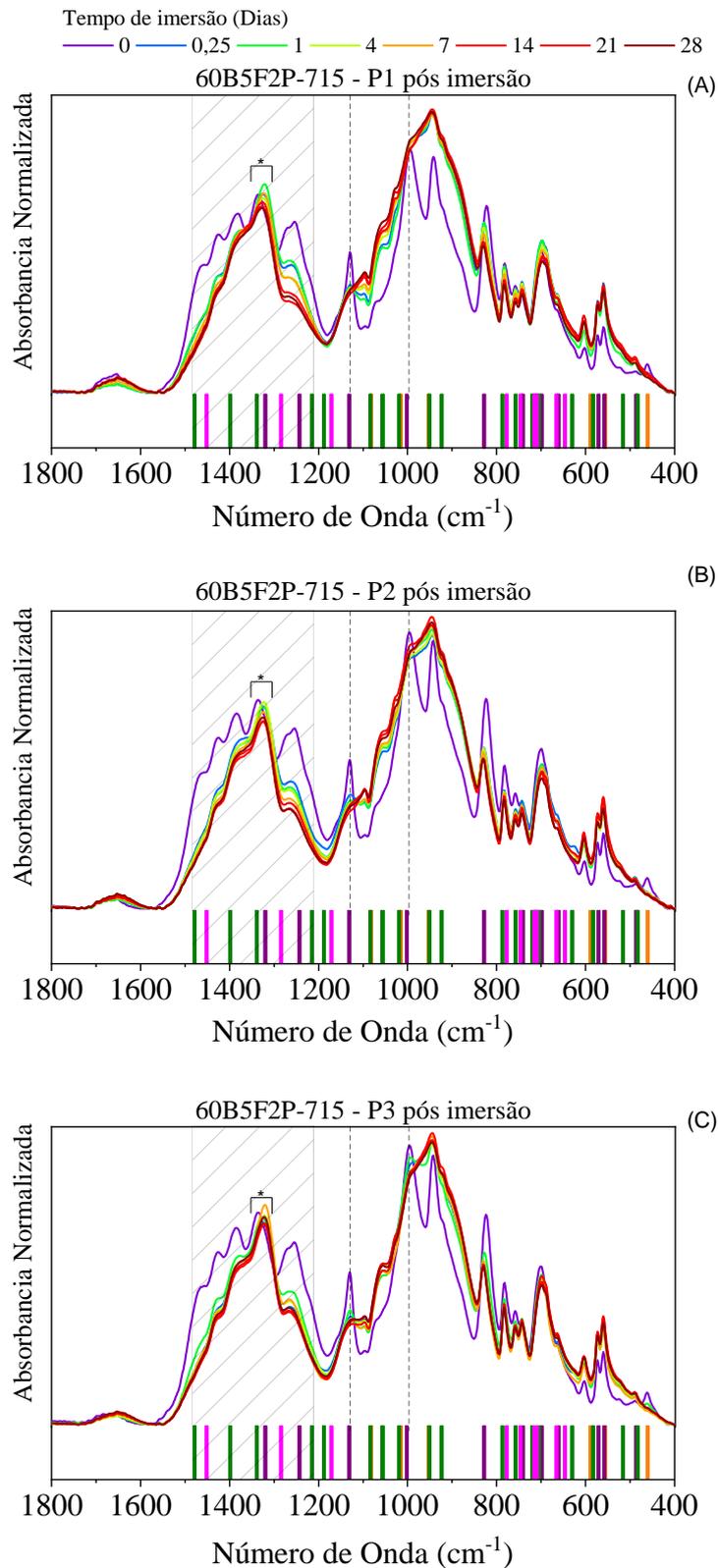


Figura 28: Espectros FTIR-ATR das amostras (A) P1, (B) P2 e (C) P3 nos períodos 0, 0,25, 1, 4, 7, 14, 21 e 28 dias de imersão com a indexação das fases cristalinas: Fluorapatita (laranja) RRUFF #R40098-3[61], CaNaB_5O_9 em roxo [8], $\text{CaNa}_3\text{B}_5\text{O}_{10}$ em verde [60] e CaB_2O_4 em rosa [62]. As linhas tracejadas e região hachurada destacam variações espectrais. O (*) destaca a banda em 1336 cm^{-1} ; $t = 0$ indica a amostra sem imersão em SBF.

4.2.6 – Teste de Citotoxicidade

A avaliação de citotoxicidade é um parâmetro importante, pois uma vez atestada sua resposta bioativa positiva, avaliar suas propriedades biológicas permite delinear seu emprego em aplicações biomédicas.

As taxas de proliferação de células são bons indicadores da saúde celular. As células MC3T3-E1, usadas para a análise de citotoxicidade quando meio de cultura, se dividem e multiplicam-se continuamente, assim a interferência no meio de cultura por agentes físicos e químicos podem afetar a saúde e o metabolismo celulares, causando toxicidade nas células por meio de diferentes mecanismos, como destruição das membranas celulares, prevenção da síntese de proteínas, ligação irreversível a receptores, inibição do alongamento de polidesoxinucleotídeos¹ e reações enzimáticas. A fim de determinar a morte celular causada por esses mecanismos, há necessidade de ensaios de citotoxicidade confiáveis e reprodutíveis [82].

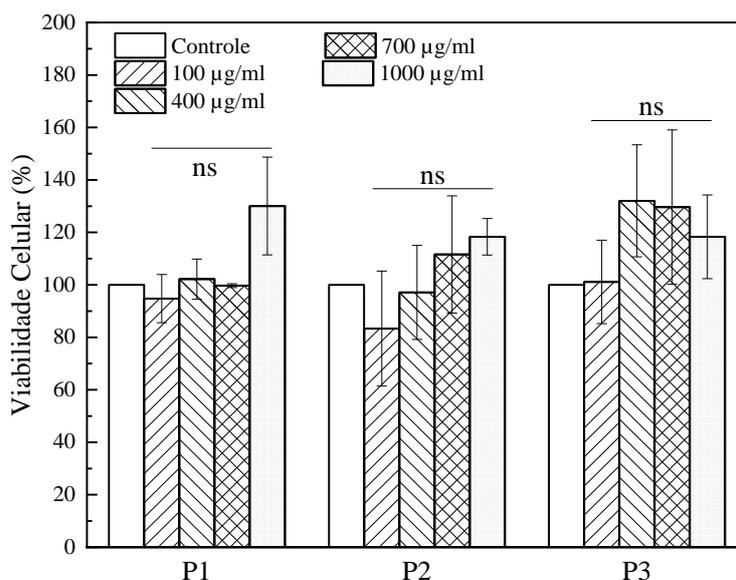


Figura 29: Viabilidade celular das amostras P1, P2 e P3, nas concentrações 100, 400, 700 e 1000 ug/ml; ns indica que não há diferença estatística significativa entre as análises de cada concentração.

A Figura 29 apresenta os resultados das análises de viabilidade celular das amostras P1, P2 e P3 em diferentes concentrações na cultura de células, as quais não mostram diferença estatística significativa quanto as concentrações. As amostras apresentam viabilidade celular maior que 50%, sendo um resultado suficiente para a classificação das amostras como não tóxicas, além de apresentar resultados com

¹ Polidesoxinucleotídeos: unidades básicas para construção da fita complementar ao DNA molde.

proliferação celular aos quais são atribuídas as concentrações que apresentam viabilidade celular acima de 100% [83]. Sustentando, assim, uma viabilidade biológica positiva das amostras, além da resposta bioativa também positiva, mostrando que independentemente do tamanho de partícula utilizado para produzir o biomaterial, as três amostras tem potencial para aplicação na área da saúde.

5 – CONCLUSÃO

As amostras P1, P2 e P3 produzidas a partir da vitrocerâmica 60B5F2P-715 com tamanho de partícula entre 9 e 103 μm , 60 e 201 μm e 118 e 342 μm , respectivamente, foram estudadas com a finalidade de avaliar a influência do tamanho de partícula em suas respostas bioativas. Os resultados mostraram que os diferentes tamanhos de partículas não influenciaram na formação das fases cristalinas da composição da vitrocerâmica 60B5F2P-715, porém influenciou na morfologia das amostras, tanto em superfície quanto em seu interior. P1 e P3 apresentaram maior quantidade e diâmetro de poros, enquanto P2 apresentou morfologia com menor quantidade de poros.

Após a imersão em SBF, em um período de 28 dias, é detectado a dissolução das fases cristalinas CaB_2O_4 e parcialmente das fases CaNaB_5O_9 , $\text{CaNa}_3\text{B}_5\text{O}_{10}$ e $\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3\text{F}$, que foram detectadas por meio das espectroscopias vibracionais. Todas as fases cristalinas presentes não apresentaram citotoxicidade em nenhuma das amostras. Durante os primeiros 7 dias houve dissolução e perda de massa das amostras, estabilizando estes processos até completar 28 dias, possivelmente devido à formação de uma camada apatítica superficial, processos estes, esperados em teste de bioatividade *in vitro*. As amostras P1 e P3 apresentaram características morfológicas de nucleação de camada apatítica em período anterior a P2, indicando que maior abertura e interconexão entre poros, permite maior permeação e aumento de interação do fluido com as amostras. Ao final dos 28 dias as três amostras apresentaram características morfológicas semelhantes.

Além da não citotoxicidade P1, P2 e P3 apresentaram viabilidade celular, em média, acima de 80% em todas as concentrações testadas.

Visto que todas as amostras estudadas apresentaram respostas bioativas satisfatórias dentre as análises realizadas destacam-se as características morfológicas, que se mostram como o principal fator na resposta bioativa. Assim, as amostras P1 e P3 apresentaram características consideradas ideais para adesão celular, vascularização e osteointegração, podendo ser empregadas diretamente como material de enxerto. Já a amostra P2 apresentou morfologia pouco porosa sugerindo estrutura rígida, podendo ser usada para a produção de *scaffolds* devido à sua grande agregação física entre as partículas, logo podendo se adequar aos materiais que são utilizados como sacrifício para a formação de poros e interconexões com formas e dimensões adaptadas para cada tecido que será aplicado.

APÊNDICE A

Nesta seção são apresentados os resultados complementares as análises apresentadas anteriormente para as amostras P1, P2 e P3 na seção de resultados e discussão.

A.1 MEV

As imagens de MEV do vidro pulverizado e peneirado em diferentes micrografias, são exibidas nas Figuras A1, A2 e A3, expondo que há a diferenciação entre intervalos de tamanho de partículas utilizadas nas confecções das pastilhas.

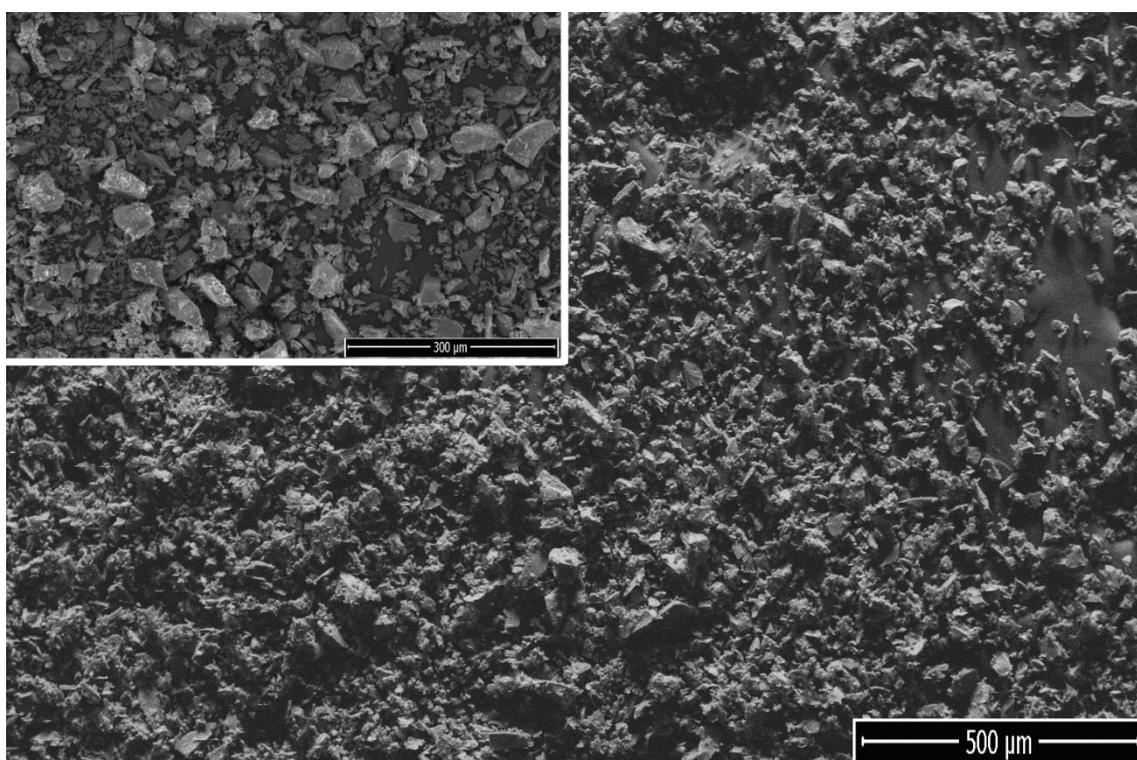


Figura A 1: Micrografia do pó do vidro bioativo 60B5F2P peneirado com peneira de *mesh* <62 μm .

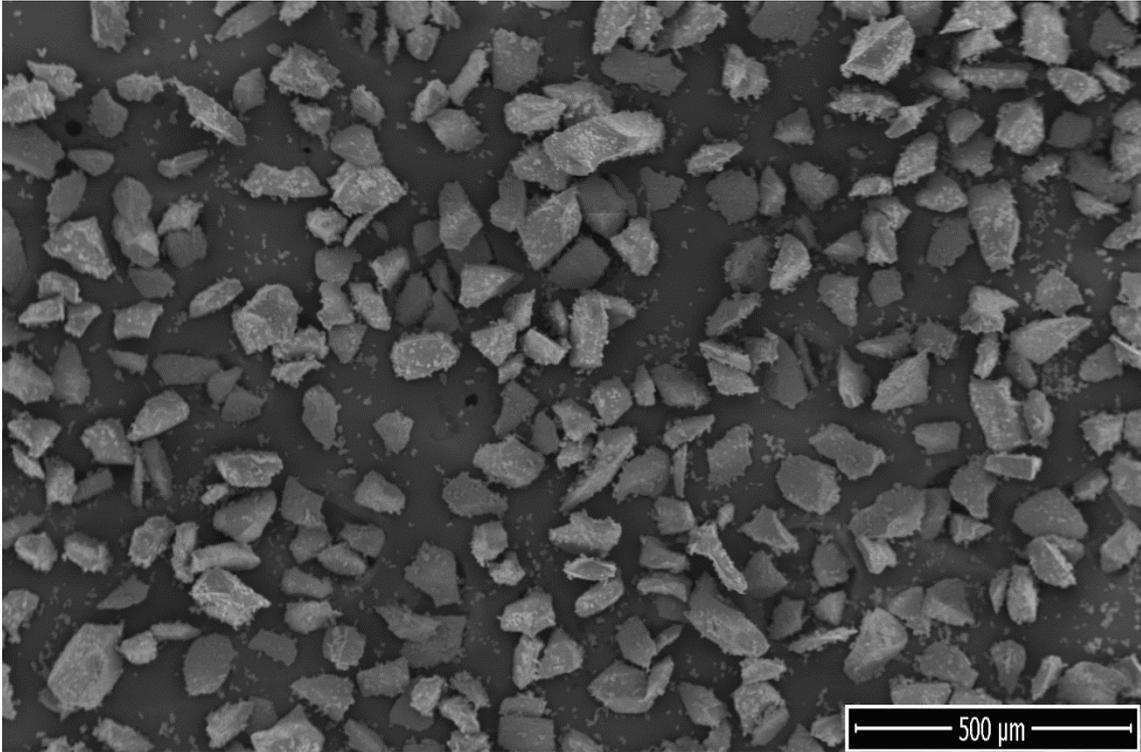


Figura A 2: Micrografia do pó do vidro bioativo 60B5F2P peneirado por peneira de *mesh* entre 93,0 e 125,0µm

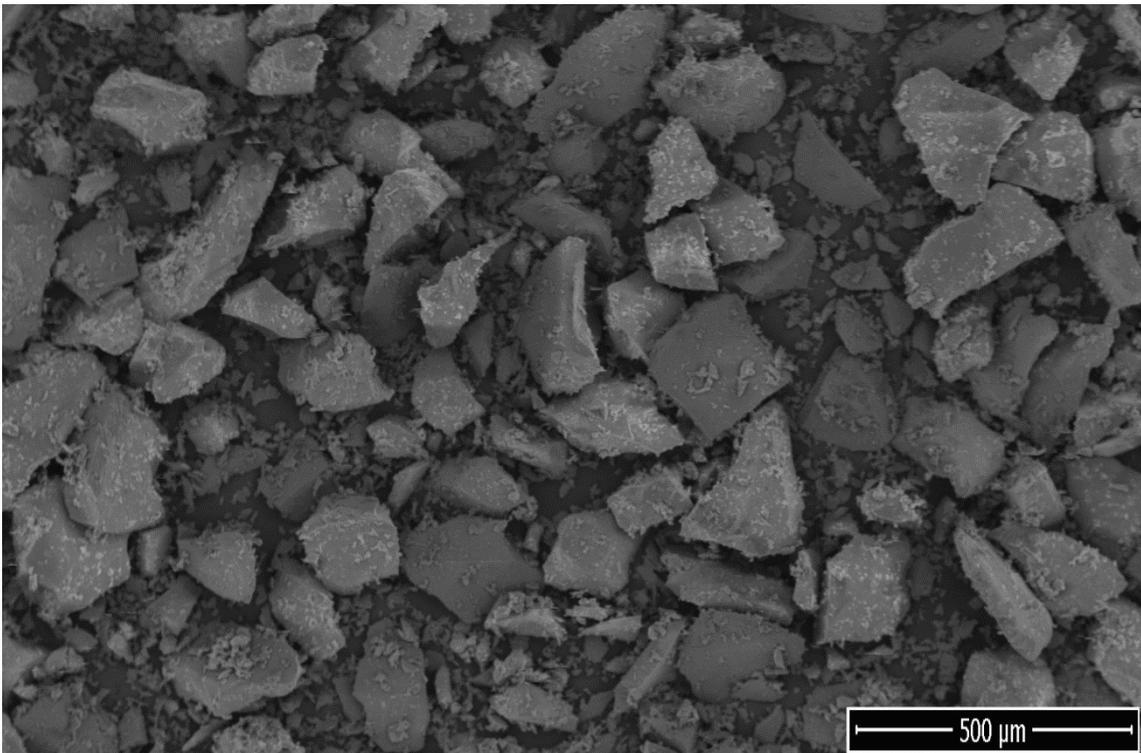


Figura A 3: Micrografia do pó do vidro bioativo 60B5F2P peneirado por peneira de *mesh* entre 180,0 e 250,0µm.

A.2 DRX

Também são apresentados os resultados e análises obtidos para as amostras P1, P2 e P3 após a imersão de 0,25, 1, 4, 7, 14, 21 e 28 dias por meio da técnica de DRX. Os percentuais das fases cristalinas indexadas foram obtidos pelo método semi quantitativo RIR.

Os difratogramas das amostras P1, P2 e P3, indexações de fase e semi-quantificação das fases $\text{CaNa}_3\text{B}_5\text{O}_{10}$, CaNaB_5O_9 e Fluorapatita são exibidos nas Figuras A4, A5 e A6, respectivamente. Em todos os períodos foi possível indexar as três fases cristalinas presentes nas amostras sem imersão.

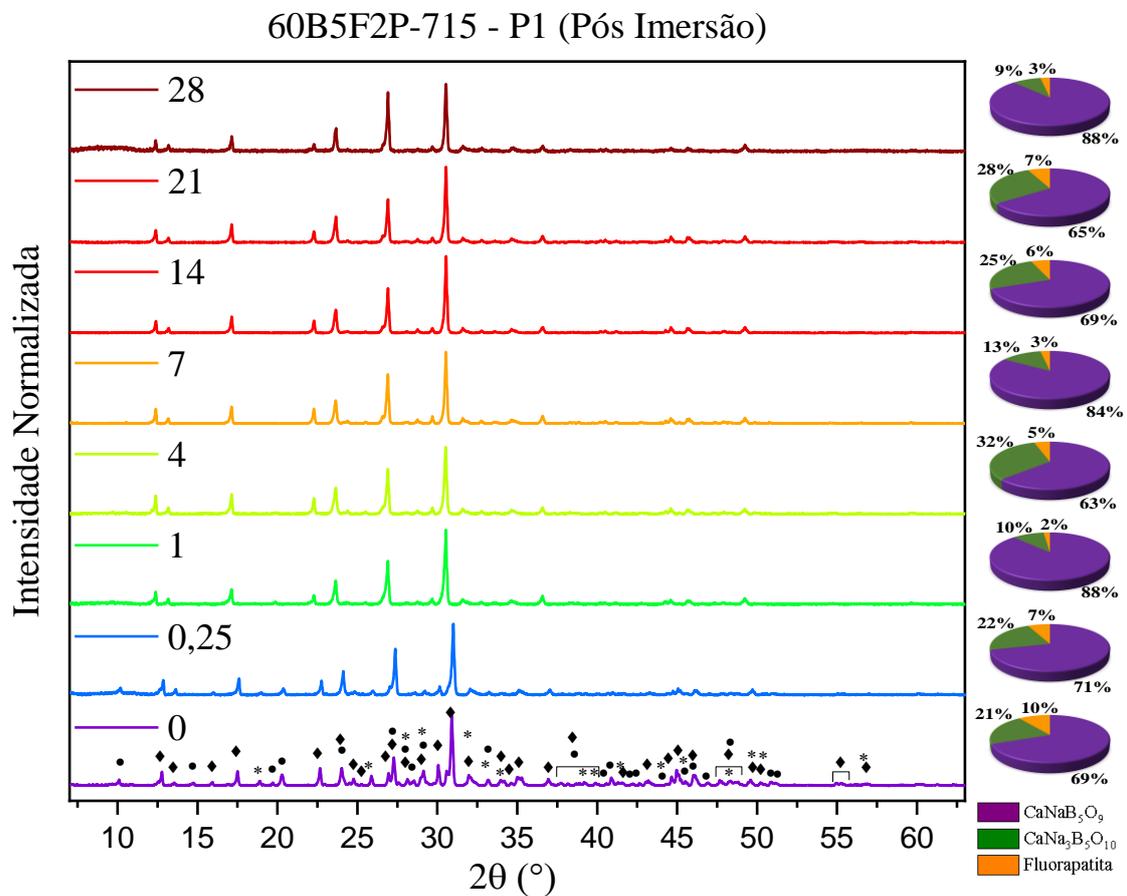


Figura A 4: Difratogramas da amostra P1 nos tempos de imersão: 0, 0,25, 1, 4, 7, 14, 21 e 28 dias. Sendo as fases $\text{CaNa}_3\text{B}_5\text{O}_{10}$, CaNaB_5O_9 e FA representadas respectivamente pelos símbolos: ●, ◆ e *; O tempo t = 0 significa a amostra sem imersão.

Como discutido na análise de EDS, a razão CaP das amostras apresenta valores característicos de ACP na forma amorfa, assim, dificultando a identificação das camadas apatíticas formadas nas amostras devido a estrutura cristalina da vitrocerâmica 60B5F2P-

715 sendo possível apenas a identificação das fases precursoras das amostras antes de imersão as quais forneceram informações a respeito da dissolução das amostras quando em imersão em SBF.

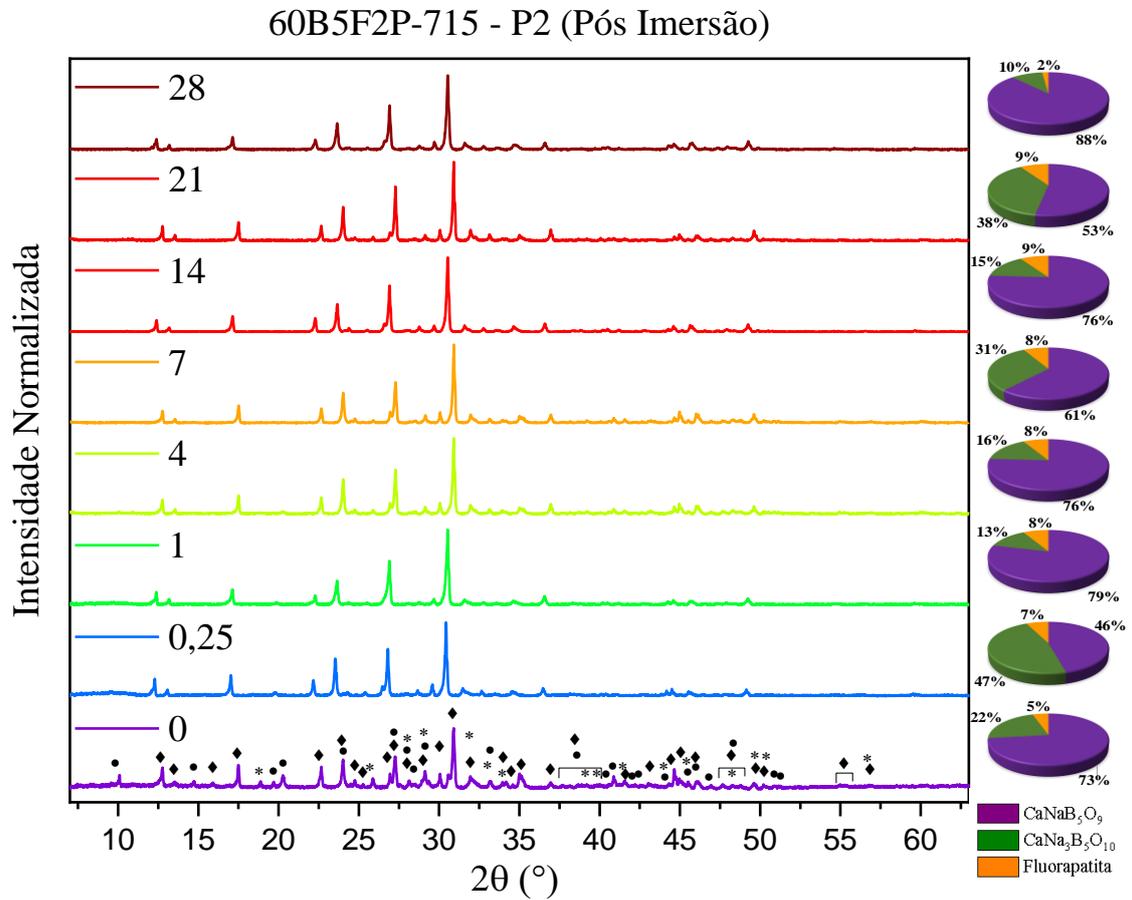


Figura A 5: Difratomogramas da amostra P2 nos tempos de imersão: 0, 0,25, 1, 4, 7, 14, 21 e 28 dias. Sendo as fases $\text{CaNa}_3\text{B}_3\text{O}_{10}$, CaNaB_5O_9 e FA representadas respectivamente pelos símbolos: ●, ◆ e *; O tempo $t = 0$ significa a amostra sem imersão.

60B5F2P-715 - P3 (Pós Imersão)

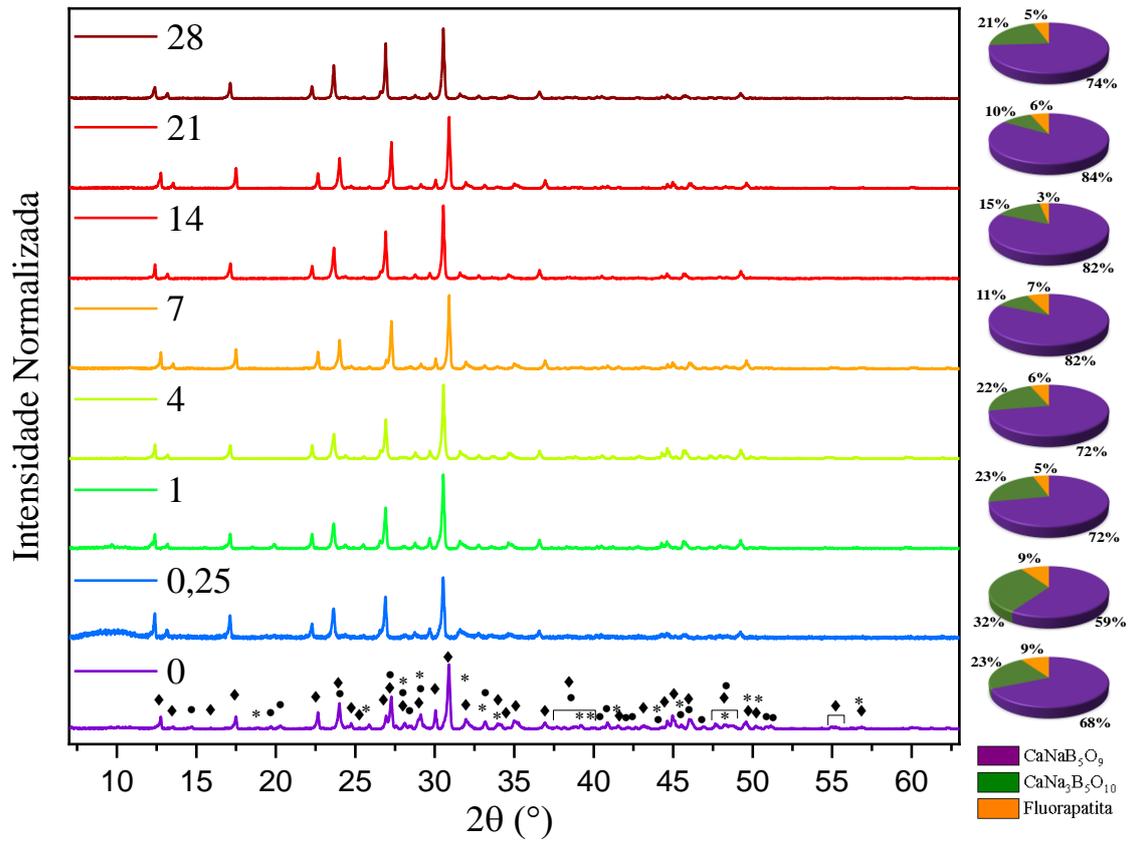


Figura A 6: Difratogramas da amostra P3 nos tempos de imersão: 0, 0,25, 1, 4, 7, 14, 21 e 28 dias. Sendo as fases $\text{CaNa}_3\text{B}_5\text{O}_{10}$, CaNaB_3O_9 e FA representadas respectivamente pelos símbolos: ●, ♦ e *; O tempo $t = 0$ significa a amostra sem imersão.

APÊNDICE B

Neste capítulo são apresentados os conceitos gerais sobre as técnicas de análises que foram utilizados no trabalho.

B.1 Análise Térmica

A análise térmica fornece informações a respeito dos efeitos que a mudança de temperatura causa num material como transições de fase, óxido-redução, reações de desidratação, decomposição entre outros. Esta técnica permite a determinação de temperaturas características, nas quais as mudanças químicas e físicas ocorrem. Há duas principais formas de análise térmica, sendo a Análise Térmica Diferencial (DTA) e Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC). O DTA determina as temperaturas característica por meio de comparação de temperaturas entre a amostra e uma referência inerte em função do tempo, já o DSC compara a energia necessária para se manter a amostra e a referência com a mesma temperatura [11, 84, 85].

Na Figura B1 apresenta uma representação esquemática do sistema de DSC, composto por porta amostras, chamados de cadinho, posicionados sobre os dois termopares do equipamento, geralmente de platina ou alumina, um cadinho é preenchido com amostra (A) enquanto o segundo fica vazio, sendo este a referência (R) da análise. É então passado um fluxo de calor pelo equipamento, e os sensores comparam a dissipação de calor entre os dois cadinhos [11, 84, 85].

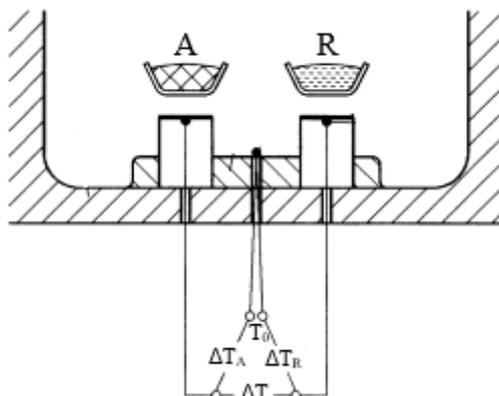


Figura B 1: Representação esquemática de um sistema de DSC, onde é monitorada a temperatura do meio T_0 e comparada com a temperatura das amostras ΔT_A e da referência ΔT_R resultando em uma diferença de temperatura ΔT . Adaptado de [84].

Para materiais vítreos a curva de análise térmica apresenta um pico endotérmico indicando a passagem pela transição vítrea do material que absorve energia térmica que é gasta no processo de nucleação e cristalização, a Figura B2 apresenta uma curva de DSC de um material vítreo. Após essa etapa a curva apresenta um pico exotérmico indicando o ponto de cristalização do material, passado o ponto cristalização é visto um pico endotérmico caracterizando o ponto de fusão do material [11].

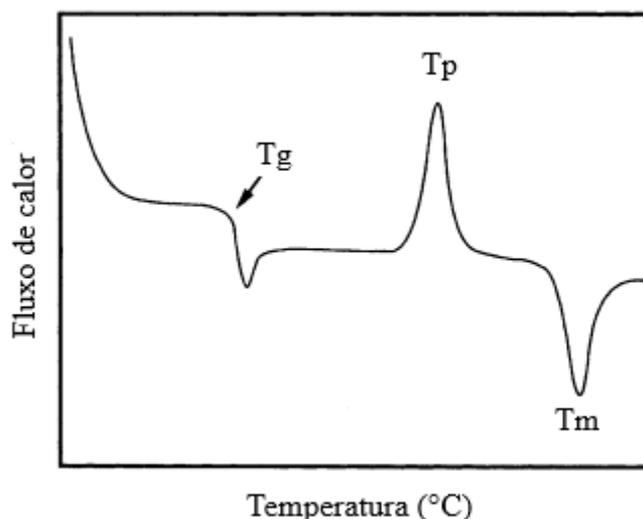


Figura B 2: Exemplo de curva de DTS de um vidro, destacando as temperaturas características de Tg, Tp e Tm. Adaptado de [11].

B.2 Difratometria de Raios-X

Um cristal é um material sólido cujos átomos constituintes são periodicamente arranjados em três dimensões diferentemente de materiais amorfos. A cristalografia refere-se à área científica que estuda o arranjo dos átomos nos sólidos, podendo abranger as mais diversas áreas do conhecimento como ciência dos materiais, química e física. A maioria dos sólidos é composta de átomos regularmente arranjados, já que o estado cristalino é energeticamente mais estável. A regularidade do arranjo atômico pode ser descrita por elementos de simetria, que determinam as propriedades físicas de um cristal. Ao realizar qualquer processo em um material, pode ser necessário descobrir quais fases cristalinas estão presentes no material. Cada fase tem um arranjo característico de átomos o que permite a caracterização e identificação dessas estruturas [86 – 88].

O arranjo regular dos átomos em um único cristal pode ser descrito pela definição de uma célula unitária fundamental junto de uma periodicidade adequada para construir

o cristal a partir da célula unitária. A célula unitária é um arranjo atômico hipotético ao qual os átomos que constituem o cristal se localizam nos vértices de um dado sólido. Esta unidade de arranjo atômico possui vizinhanças idênticas correspondentes a rede tridimensional. Uma forma geral da célula unitária é um paralelepípedo que contém apenas um ponto de rede. O tamanho e a forma da célula unitária são descritos por três eixos **a**, **b** e **c** desenhados de um canto a outro da célula. As direções x, y e z de um cristal e sua célula unitária são consideradas paralelas a esses vetores de células unitárias. Os comprimentos dos eixos **a**, **b** e **c** são denotados por a, b e c, e os ângulos entre eles, α , β e γ . Esses valores são chamados de parâmetros de rede [86 – 88].

Os cristais são classificados em sete sistemas cristalinos de acordo com seus elementos de simetria rotacional (incluindo simetria de inversão de rotação). Sendo: triclinicos, monoclinicos, ortorrômbicos, trigonais, tetragonais, hexagonais e cúbicos, que são subdivididos por células simples, corpo centrado, face centrada e base centrada denominados de redes de Bravais [88]. A Tabela B1 apresenta os parâmetros de rede para cada estrutura.

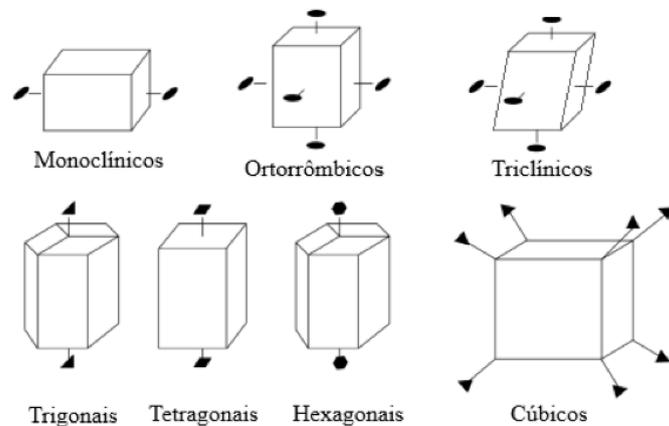


Figura B 3: Elementos de simetria necessários para cada sistema cristalino os símbolos •, ◆, ▲ representam os eixos de simetria. Adaptado de [88].

Tabela B 1: Parâmetros de rede cristalina [86].

Sistema Cristalino	Dimensão da célula unitária	Rede de Bravais
Triclinicos	$a \neq b \neq c; \alpha \neq \beta \neq \gamma$	Simplex
Monoclínicos	$a \neq b \neq c; \alpha = \beta = 90^\circ; \gamma \geq 90^\circ$	Simplex
		Base Centrada
Ortorrômbicos	$a \neq b \neq c; \alpha = \beta = \gamma = 90^\circ$	Simplex
		Corpo Centrado
		Face Centrada

		Base Centrada
Trigonais	$a = b = c; \alpha = \beta = 90^\circ; \gamma \neq 90^\circ$	Simples
Tetragonais	$a = b \neq c; \alpha = \beta = \gamma = 90^\circ$	Simples
		Corpo Centrado
Hexagonais	$a = b \neq c; \alpha = \beta = 90^\circ; \gamma = 120^\circ$	Simples
Cúbicos	$a = b = c; \alpha = \beta = \gamma = 90^\circ$	Simples
		Corpo Centrado
		Face Centrada

Um grande aliado ao estudo estrutural de materiais é a análise de espectros obtidos a partir da interação radiação – matéria. A fim de analisar e estudar sistemas cristalino por meio desta técnica é necessário a utilização de uma radiação com propriedades de interação com a rede cristalina, ou seja, que possam ter ordem de grandeza de angstroms (Å). Uma radiação eletromagnética desta ordem de tamanho são os raios-X [87].

Os raios-X são gerados quando os elétrons acelerados a uma velocidade muito alta, desaceleram rapidamente. Quando a energia dos elétrons acelerados é maior que um valor limite, picos agudos aparecem em certos comprimentos de onda sobrepostos à radiação branca. Eles são chamados de linhas características e os comprimentos de onda desses picos dependem apenas do material que é irradiado. Se um dos elétrons que atingem o alvo tiver energia suficientemente alta, ele pode arrancar um elétron da camada K do átomo alvo, deixando o átomo em um estado excitado. Isso resultará na transferência de um elétron de camadas externas para o nível de K vago, a fim de diminuir a energia total. Esta transferência será seguida pela emissão de um fóton de raios-X, cuja energia é igual à diferença de energia entre os dois estados. A radiação emitida como resultado de tal processo terá, um comprimento de onda característico do elemento alvo. O nível K vago pode ser preenchido por um elétron de qualquer uma das camadas externas. Quando os dois orbitais envolvidos na transição são adjacentes, a linha é representada por um subscrito α . Se os orbitais envolvidos estiverem separados por dois níveis, a linha é designada como β . Por exemplo, quando um elétron é ejetado da camada K e seu sítio vago é ocupado por um elétron da camada L, a linha K_α é emitida. A transição K_β refere-se ao caso em que a camada K vazia é preenchida por um elétron da camada M [88].

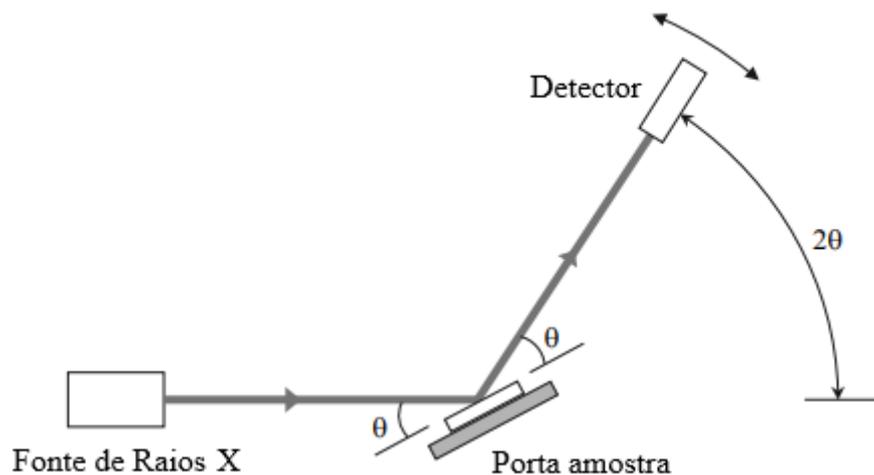


Figura B 4: Componentes principais de um Difratômetro de Raios-X. Adaptado de [87].

A análise da estrutura cristalina de um material utilizando ondas de raios-X é denominada de difratometria de raios-X (DRX), esta técnica funciona utilizando o princípio de interferência de ondas. Os raios-X contendo comprimento de onda da ordem de tamanho inter-planar dos cristais interage com o sólido formando interferências destrutivas e construtivas. O dispositivo utilizado para as análises é ilustrado na Figura B4. O resultado da análise é denominado difratograma que é resultado da leitura das figuras das interferências construtivas provenientes da difração das ondas de raios-X em função do ângulo de radiação [87].

Como o arranjo atômico é característico para cada composição química, a partir do difratograma é possível a caracterização da rede cristalina presente no material comparando a banco de dados já existentes como: JCPDS (Joint Committee of Powder Diffraction Standards), ICDD (International Center for Diffraction Data), ICSD (Inorganic Crystal Structure Database) e COD (Crystallography Open Database) [87].

Os vidros por apresentarem estruturas amorfas não formam padrões de difração com ondas de raios-X, assim, o difratograma do vidro apresenta halos enquanto a vitrocerâmica que contém estrutura cristalina apresenta picos característicos possibilitando a identificação das fases cristalinas presentes no material a partir dos componentes presentes na matriz vítrea [86]. A Figura B5 ilustra um difratograma de uma amostra de vidro em comparação com uma vitrocerâmica.

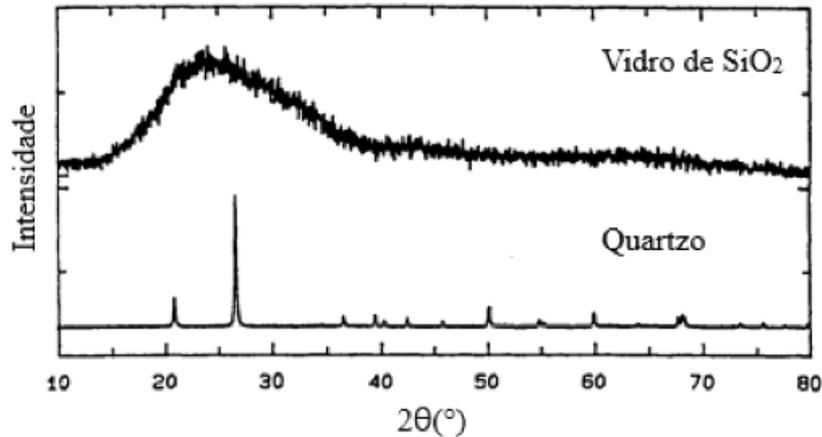


Figura B 5: Difratograma de um vidro de SiO₂ em comparação com o difratograma de Quartzo obtido a partir do tratamento térmico da rede vítrea de SiO₂. Adaptado de [86].

B.3 Espectroscopia Vibracional

A interpretação de dados fornecidos pelo fenômeno de interação radiação - matéria resultam em um conjunto de técnicas intensamente empregadas na caracterização de materiais, podendo fornecer informações a respeito do arranjo atômico, composição molecular, tipos de ligações químicas e etc. Dentro dessas análises se encontra a espectroscopia vibracional.

A origem do espectro, na espectroscopia molecular, é resultado de mecanismo como a absorção, emissão ou espalhamento de um fóton quando a energia de uma molécula muda, resultado de transições eletrônicas, mudanças de estado rotacional e/ou vibracional, podendo conter informações relacionadas a valores de resistência, comprimento e ângulos de ligações químicas. Eles também fornecem uma maneira de determinar uma variedade de propriedades moleculares, como dimensões moleculares, formas e momentos de dipolo. A espectroscopia molecular também é útil para astrofísicos e cientistas ambientais, pois a composição química do espaço interestelar e das atmosferas planetárias pode ser inferida a partir de seus espectros rotacionais, vibracionais e eletrônicos [89].

Classicamente, o movimento vibratório de uma molécula pode ser descrito como um conjunto de esferas, representando átomos, ligados por molas, representando as ligações químicas por exemplo a molécula de água o hidrogênio se ligaria ao oxigênio por molas e a força de interação entre os átomos pode ser descrita de forma similar a Lei

de Hooke, sendo as ligações de O–H conectadas por uma mola relativamente mais forte que a mola que liga os átomos de hidrogênio [90].

A perturbação de qualquer uma dessas ligações causa a movimentação de toda a molécula, podendo apresentar alongamento de ligações e flexão de ângulos. Este movimento pode ser dividido em uma combinação das chamadas vibrações normais do sistema que são sobrepostas em proporções variáveis. Modos normais envolvem acoplamento entre os movimentos de alongamento ou flexão dos átomos em uma cadeia reta, uma cadeia ramificada ou um anel. Os modos de vibração de alongamento e flexão podem ocorrer em diferentes combinações, tais como, balanço, torção, abano e respiração (em anéis e cadeias fechadas) [90]. A Figura B6 ilustra alguns modos vibracionais.

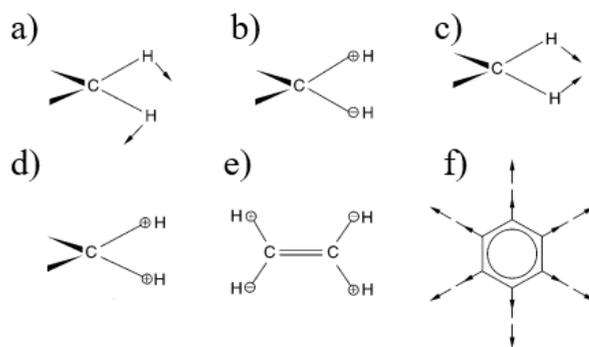


Figura B 6: Ilustração de a) balanço, b) torção, c) tesoura e d) vibrações de balanço no grupo a CH_2 , e) vibração de torção e f) vibração de respiração do anel; as setas e símbolos + e - indicam o sentido de vibração. Adaptado de [90].

B.3.1 Espectroscopia FTIR

A espectroscopia FTIR (Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier, do inglês “*Fourier Transform Infrared Spectroscopy*”) é uma técnica analítica que envolve a análise de interações entre a matéria e a radiação na região do infravermelho. É amplamente utilizada para identificar compostos químicos, determinar estruturas moleculares e investigar ligações químicas em amostras.

O princípio básico da espectroscopia FTIR envolve a passagem de radiação infravermelha através de uma amostra, enquanto a frequência dessa radiação é variada. A medida da absorção e transmissão da radiação resultante produz um espectro infravermelho, que mostra as frequências nas quais as ligações químicas na amostra absorvem energia infravermelha. Cada tipo de ligação química possui um conjunto característico de frequência de absorção, permitindo a identificação de grupos funcionais e composição molecular. A absorção de radiação infravermelha ocorre quando há uma

mudança no momento de dipolo elétrico da molécula durante uma transição vibracional. Isso significa que para ocorrer uma absorção significativa de energia, a simetria da molécula deve ser quebrada durante a vibração. Essa regra é frequentemente referida como “regra de seleção para transições IR ativas”. Se uma vibração não altera o momento de dipolo da molécula, ela será “inativa” no espectro IR [66].

Espectrômetros que operam no infravermelho médio e longínquo utilizam a transformada de Fourier para converter um sinal no domínio do tempo em um espectro no domínio da frequência, fornecendo informações sobre as vibrações moleculares presentes em um material. O elemento óptico principal de um espectrômetro de FTIR é um interferômetro de Michelson, um dispositivo para analisar as frequências presentes em um sinal composto por diferentes frequências [89].

A obtenção do espectro de absorção pode ocorrer utilizando um acessório de Reflectância Total Atenuada (ATR) acoplado a um espectrômetro no infravermelho (FTIR). O acessório de ATR possui um cristal com alto índice de refração, onde é posicionado a amostra, o feixe de radiação passa por esse cristal em ângulo crítico, de forma que é totalmente refletido pelo cristal, a amostra posicionada em contato com o cristal absorve parte da radiação incidente refletida, o sensor detecta essa absorção comparando com um feixe ideal, como ilustrado pela Figura B7 [91].

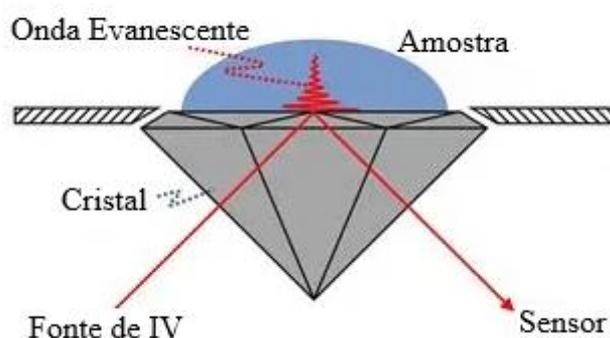


Figura B 7: Ilustração de um caminho óptico em um cristal ATR de reflexão única. Adaptado de [93]

B.3.2 Espectroscopia Raman

O efeito Raman foi detectado experimentalmente pelo físico Chandrasekhara Venkata Raman em 1928, em seu experimento Raman utilizou uma lâmpada de mercúrio

como fonte de onda eletromagnética, um prisma de vidro como dispersivo e filmes fotográficos [94].

Ao se atingir uma superfície com uma onda eletromagnética, uma fração da luz é absorvida e o restante é refletido. Parte da onda absorvida é dissipada na forma de calor e outra retransmitida na forma de luz espalhada. Parte da luz espalhada é composta por uma frequência diferente da frequência da luz incidente, a esse processo é dado o nome de espalhamento Raman (inelástico), Figura B8. A outra parte da luz espalhada apresenta a mesma frequência da luz incidente, esse tipo de espalhamento é chamado de Rayleigh (elástico).

O espalhamento inelástico da luz é classificado de dois modos: Stokes quando ocorre que a frequência da luz espalhada é maior que a frequência da luz incidente e anti-Stokes quando a frequência da radiação espalhada é menor que a frequência da luz incidente [64].

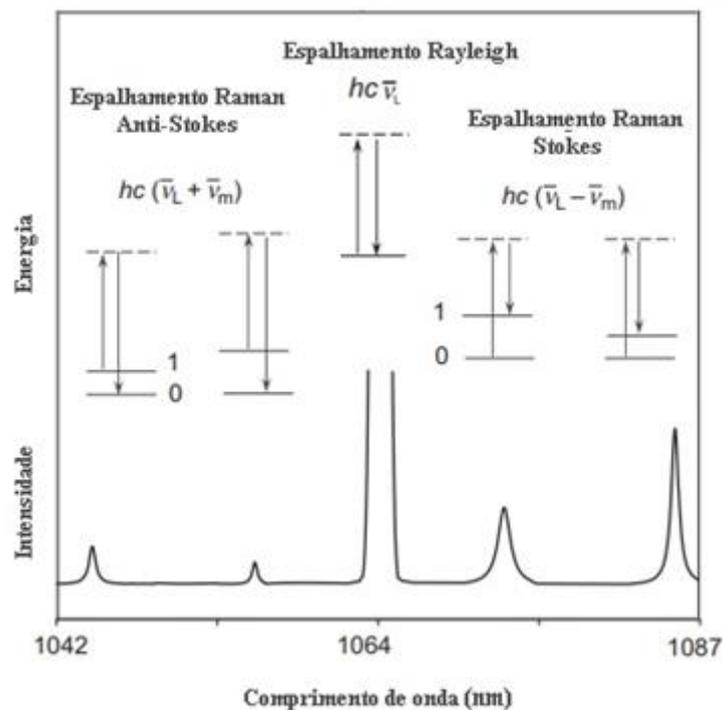


Figura B 8: Ilustração do espalhamento Raman Stokes e Anti-Stokes. ν_L : comprimento de onda incidente ν_m : comprimento de onda espalhado. Adaptado de [93].

Uma onda eletromagnética ao interagir com a matéria pode causar vibrações de diferentes modos nas moléculas, essa oscilação cria uma mudança periódica da posição dos núcleos que constituem a molécula, o que acarreta uma oscilação do momento de

dipolo induzido pela onda eletromagnética. A principal característica de um composto Raman-ativo é que além da oscilação do momento de dipolo induzido é que a polarizabilidade do composto também deve oscilar com a mudança da posição do núcleo [94].

B.4 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

A microscopia é utilizada para ampliação de imagens com o objetivo de analisar superfícies as quais o olho humano não é capaz de enxergar. Os mais antigos métodos de ampliação de imagem é a utilização de lupas, seguido de microscópios ópticos, esses microscópios estão limitados a ampliações de 2000 vezes, a partir dessa ampliação, a microscopia eletrônica de varredura passa a ser a principal ferramenta para análise de superfícies [97].

Um microscópio eletrônico de varredura consiste em um canhão de elétrons que produz os feixes de elétrons, a óptica eletromagnética guia o feixe e o focaliza. Os detectores coletam os elétrons que vêm da amostra, estes são espalhados ou emitidos da amostra e a energia do elétron detectado junto com sua intensidade e localização da emissão utilizadas para montar a imagem [98]. A figura B9 mostra os componentes fundamentais para um equipamento de MEC.

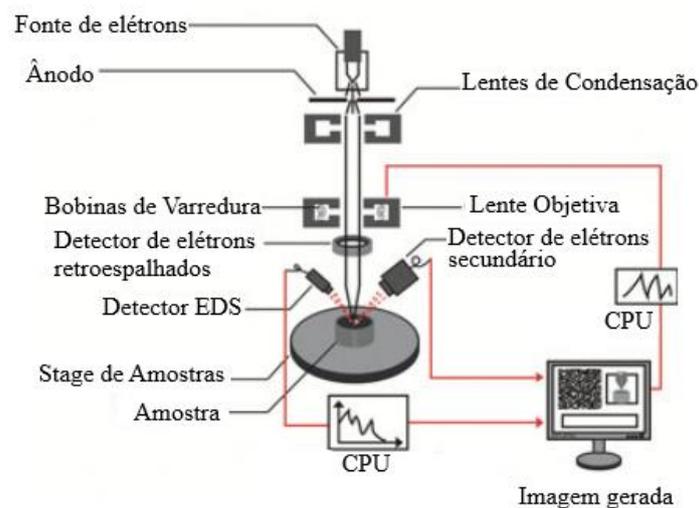


Figura B 9: Ilustração dos componentes básicos do MEV. Adaptado de [99].

As imagens podem ser formadas por dois métodos de obtenção de dados. O primeiro método é originado do espalhamento inelástico dos elétrons, de baixa energia, que são absorvidos pela superfície do material e emitidos fornecendo imagens topográficas de alta resolução, podendo gerar imagens de até 3 nm. Quanto ao segundo método, chamado de retroespalhamento, fornece imagens a partir dos elétrons espalhados elasticamente [97].

Além da imagem topográfica da amostra o equipamento de MEV pode fornecer informações a respeito da composição do material por meio da interação do feixe de elétrons primário com o material da amostra que resulta na geração de raios-x característicos que formam coletivamente um sinal de raios-X. Utilizando um detector de energia dispersiva (EDS) de raios-X para coletar o sinal, medir sua energia e distribuição de intensidade, é possível analisá-lo de maneira a identificar elementos e determinar as concentrações de elementos na região analisada da amostra [99].

B.5 Espectroscopia de Emissão em Plasma de Micro-Ondas (MP-AES)

A espectroscopia de emissão atômica com plasma de micro-ondas é baseada no fenômeno físico de emissão atômica. Este efeito ocorre um átomo, de um elemento específico, é excitado, emitindo luz em um padrão característico de comprimentos de onda quando retorna ao estado fundamental. As fontes de emissão atômica incluem o plasma de micro-ondas (MP) e o argônio acoplado indutivamente plasma (ICP), ambos funcionam em alta temperatura, logo, são excelentes fontes de excitação para espectroscopia de emissão atômica. O plasma de micro-ondas alimentado com nitrogênio atinge temperaturas aproximando-se de 5.000 K. Nessas temperaturas, a emissão atômica é forte, produzindo excelente detecção limites e faixa dinâmica linear para a maioria dos elementos [100].

A geração de dados funciona da seguinte forma: a amostra em estado líquido é bombeada em forma de aerossol com fluxo constante para a câmara de plasma, onde é evaporada e dissociada em átomos devido à energia térmica proveniente do plasma de N₂. Então ocorre a excitação atômica induzida pelo plasma e o decaimento eletrônico gera ondas eletromagnéticas de comprimentos de onda na região do ultravioleta e visível, que são direcionadas por campos magnéticos a um monocromador que separa os diferentes

comprimentos de onda. Cada átomo emite comprimentos de ondas característicos que são lidos por um dispositivo de carga acoplado e identificados via *software* [102]. Na Figura B10 é ilustrado um esquema para a obtenção de dados por MP-AES.

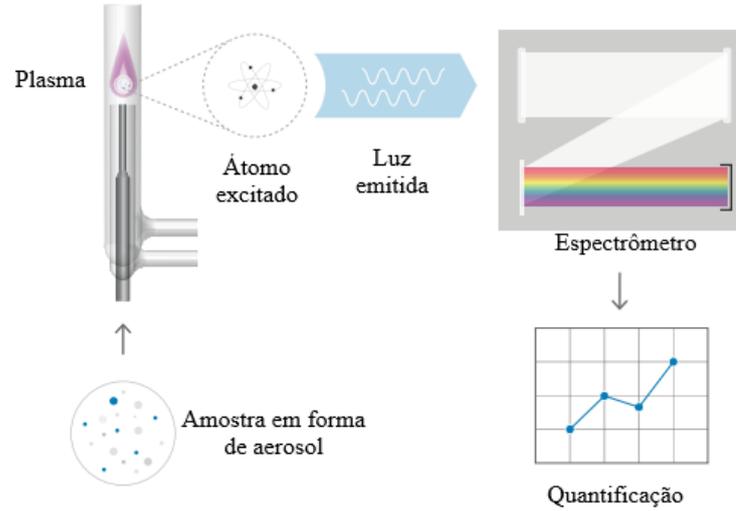


Figura B 10: Diagrama esquemático de um espectrômetro de emissão atômica de plasma de micro-ondas. Adaptado de [100].

REFERÊNCIAS

- [1] Soares, G. A. "Biomateriais" Fórum de Biotecnologia de Biomateriais. Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2005.
- [2] Mahmood, J. *et al.* "Geometric effect of matrix upon cell differentiation: BMP-induced osteogenesis using a new bioglass with a feasible structure." *The Journal of Biochemistry* 129.1 (2001): 163-171.
- [3] Tölli, H. *et al.* "Bioglass as a carrier for reindeer bone protein extract in the healing of rat femur defect." *Journal of Materials Science: Materials in Medicine* 21 (2010): 1677-1684.
- [4] Reddi, A. H. e Anand Reddi. "Bone morphogenetic proteins (BMPs): from morphogens to metabologens." *Cytokine & growth factor reviews* 20.5-6 (2009): 341-342.
- [5] Hench, L. L. "An introduction to bioceramics." Vol. 1. World scientific, 1993.
- [6] Cerruti, M. *et al.* "Effect of pH and ionic strength on the reactivity of Bioglass® 45S5." *Biomaterials* 26.14 (2005): 1665-1674.
- [7] Cerruti, M. *et al.* "An analytical model for the dissolution of different particle size samples of Bioglass® in TRIS-buffered solution." *Biomaterials* 26.24 (2005): 4903-4911.
- [8] da Cruz, A.C.C. *et al.* "Physico-chemical characterization and biocompatibility evaluation of hydroxyapatites." *Journal of oral science* 48.4 (2006): 219-226.
- [9] Granito, R. N. *et al.* "Effects of biosilicate and bioglass 45S5 on tibial bone consolidation on rats: a biomechanical and a histological study." *Journal of Materials Science: Materials in Medicine* 20 (2009): 2521-2526.
- [10] Cannillo, V. *et al.* "Fabrication of 45S5 bioactive glass-polycaprolactone composite scaffolds." 17th International conference on composite materials (ICCM-17), Edinburgh, UK. 2009.
- [11] J. E. Shelby "Introduction to glass science and technology." Royal Society of Chemistry, 2005.

- [12] Zachariasen, W. H. "The atomic arrangement in glass." *Journal of the American Chemical Society* 54.10 (1932): 3841-3851.
- [13] Jones, J. e Clare, A. "Bioglasses: an introduction." John Wiley & Sons, 2012.
- [14] Brauer, D. S. " Bioactive glasses — structure and properties." *Angewandte Chemie International Edition* 54.14 (2015): 4160-4181.
- [15] Boccaccini A. R. *et al.* "Bioactive glasses: Fundamentals, technology and applications." Royal Society of Chemistry, 2016.
- [16] Zarzycki, J. "Glasses and the vitreous state." 1. ed. [S.l.]: Cambridge University Press, v. 1, 1991
- [17] Le Bourhis E. "Glass: mechanics and technology." 1. ed.: Pearson, 2014.
- [18] Wolfram, H. *et al.* "Glass-ceramic technology" John Wiley & Sons, 2019.
- [19] Barsoum, M. "Fundamentals of ceramics." CRC press, 2019.
- [20] Hu, Y. *et al.* "Crystallization kinetics of the $\text{LiNbO}_3\text{-SiO}_2\text{-Al}_2\text{O}_3$ glass." *Journal of non-crystalline solids* 278.1-3 (2000): 170-177.
- [21] Matusita, K. *et al.* " Kinetic study of crystallization of glass by differential thermal analysis - criterion in the application of the Kissinger graph." *Journal of Non-Crystalline Solids* 38 (1980): 741-746.
- [22] Ray, C. S., *et al.* "Crystallization kinetics of a lithia–silica glass: effect of sample characteristics and thermal analysis measurement techniques." *Journal of the American Ceramic Society* 74.1 (1991): 60-66.
- [23] Costa, B. J. *et al.* "Non-isothermal study of the devitrification kinetics of fluorindate glasses." *Journal of non-crystalline solids* 273.1-3 (2000): 76-80.
- [24] Erol, M. S. *et al.* "The influence of the binder on the properties of sintered glass-ceramics produced from industrial wastes." *Ceramics International* 35.7 (2009): 2609-2617.
- [25] Ratner, B. D. *et al.* "A history of biomaterials." *Biomaterials Science*. Academic Press, 2020. 21-34.

- [26] Park, J. e Roderic S. L. "Biomaterials: an introduction." Springer Science & Business Media, 2007.
- [27] Raghavendra, G. M. *et al.* "Biomaterials: design, development and biomedical applications." Nanotechnology applications for tissue engineering. William Andrew Publishing, 2015. 21-44.
- [28] Shi, D. "Introduction to biomaterials." World Scientific, 2005.
- [29] Ning, C. *et al.* "Fourth-generation biomedical materials." Mater. Today 19.1 (2016): 2-3.
- [30] Yang, Z. C. "Finite element analysis for biomedical engineering applications." CRC Press, 2019.
- [30] Hench, L. L. "The story of Bioglass®." Journal of Materials Science: Materials in Medicine 17.11 (2006): 967-978.
- [31] Soares, S. *et al.* "Porous Bioglass Scaffold for Orthopedics Applications." Materials Science 22.2 (2016): 279-284.
- [32] Jones J. e Clare A. "Bio-glasses: an introduction." John Wiley & Sons, 2012.
- [33] Wolfram H. e Beall G. H. "Glass-ceramic technology." John Wiley & Sons, 2019.
- [34] Kokubo Tadashi e Hiroaki Takadama. "How useful is SBF in predicting in vivo bone bioactivity?." Biomaterials 27.15 (2006): 2907-2915.
- [35] Hench, L. L. e June W. "Surface-active biomaterials." Science 226.4675 (1984): 630-636.
- [36] Islam, M. T. *et al.* "Bioactive calcium phosphate-based glasses and ceramics and their biomedical applications: a review." Journal of tissue engineering 8 (2017): 2041731417719170.
- [37] Zhu, P. *et al.* "The effect of surface charge on hydroxyapatite nucleation." Biomaterials 25.17 (2004): 3915-3921.
- [38] Portes, P. N. Tese de Doutorado. "Caracterização e Avaliação da Bioatividade *in vitro* do Sistema Vítreo $60\text{B}_2\text{O}_3 - 5\text{CaF}_2 - (20-x)\text{Na}_2\text{O} - (15-x)\text{CaO} - 2x\text{P}_2\text{O}_5$ ($x=0, 1, 2$)". Universidade Estadual de Maringá, 2018

- [39] Nascimento, A. Tese de Doutorado “Estudo da dinâmica de cristalização em vidros bioativos do sistema $60\text{B}_2\text{O}_3 - 8 \text{CaO} - 4\text{P}_2\text{O}_5 - 18\text{Na}_2\text{O} - 10\text{CaF}_2$ tratados termicamente”. Universidade Estadual de Maringá 2021.
- [40] Palácio, R. S. Tese de Doutorado “Estudo de Compósitos de Vidro de Cálcio-Sódio-Borato e Hidroxiapatita: Caracterização e Avaliação de Bioatividade *in vitro*”. Universidade Estadual de Maringá 2023.
- [41] Gibin, M. S. Dissertação de Mestrado “Influência do Tratamento Térmico na Sinterização, Cristalização e na Bioatividade de Vidros de Cálcio-Sódio-Borato.” Universidade Estadual de Maringá 2021.
- [42] Musgraves, J. D. *et al.* “Springer handbook of glass. Part A.” Springer, 2019.
- [43] Saravanan, S. *et al.* "Thermal and structural properties of mixed alkali and transition metal ions in sodium borate glass." *Int. J. Recent Res. Rev* 8 (2015).
- [44] Soliman, A. "XRD, DTA and density studies lithium borate glasses containing copper." *Armenian Journal of Physics* 1.3 (2008): 188-197.
- [45] Cullity, B. D. “Elements of X-ray Diffraction”. Addison-Wesley Publishing, 1956.
- [46] Disponível em: <https://www.icdd.com/>. Acesso em 13/12/2023.
- [47] Hubbard C. R. e Snyder, R. L. “RIR - measurement and use in quantitative XRD”. *Powder Diffraction*. 1988.
- [48] Mohmoh, H. *et al.* "Structural relationship between vitreous P_2O_5 and its relevant crystalline polymorphs by Raman spectroscopy." *Phosphorus Research Bulletin* 13 (2002): 187-192.
- [49] Ouis, M. A. *et al.* "Corrosion mechanism and bioactivity of borate glasses analogue to Hench's bioglass". *Processing and application of ceramics* 6.3 (2012): 141-149.
- [50] Şener, S. *et al.* "Changes in the structure of ulexite on heating." *Thermochimica Acta* 362.1-2 (2000): 107-112.
- [51] Yao, A. *et al.* "Structure and crystallization behavior of borate-based bioactive glass." *Journal of materials science* 42 (2007): 9730-9735.
- [52] Meera, B. N. e J. Ramakrishna. "Raman spectral studies of borate glasses." *Journal of Non-Crystalline Solids* 159.1-2 (1993): 1-21.

- [53] Saranti, A. *et al.* "Bioactive glasses in the system CaO–B₂O₃–P₂O₅: preparation, structural study and *in vitro* evaluation." *Journal of Non-Crystalline Solids* 352.5 (2006): 390-398.
- [54] Kamitsos, E. I. e Georgios D. C. "Borate glass structure by Raman and infrared spectroscopies." *Journal of molecular structure* 247 (1991): 1-16.
- [55] Yadav, A. K. e Prabhakar S. "A review of the structures of oxide glasses by Raman spectroscopy." *RSC advances* 5.83 (2015): 67583-67609.
- [56] Larink, D. *et al.* "Mixed network former effect in ion-conducting alkali borophosphate glasses: structure/property correlations in the system [M₂O] 1/3 [(B₂O₃) x (P₂O₅) 1-x] 2/3 (M= Li, K, Cs)." *The Journal of Physical Chemistry C* 116.50 (2012): 26162-26176.
- [57] Xue, W. *et al.* "Effect of temperature on the Raman spectra of Ca₅(PO₄)₃F fluorapatite." *European Journal of Mineralogy* 30.5 (2018): 951-956.
- [58] Williams, Q. e Knittle, E. "Infrared and raman spectra of Ca₅(PO₄)₃F₂ - fluorapatite at high pressures: Compression-induced changes in phosphate site and Davydov splittings." *Journal of Physics and Chemistry of Solids* 57.4 (1996): 417-422.
- [59] Becker, P. *et al.* "Linear optical properties and Raman spectroscopy of natural fluorapatite." *Crystal Research and Technology* 51.4 (2016): 282-289.
- [60] Almou, M e Rulmont, A. "Vibrational spectrum of trisodium calcim pentaborate Na₃Ca(B₅O₁₀) and probable occurrence of the discrete pentaborate ion (B₅O₁₀)⁻⁵ in some glassy metaborates". *Journal de la Société Ouest-Africaine de Chimie*, 2001.
- [61] Lafuente, B. *et al.* "The power of databases: The RRUFF Project". De Gruyter, 2015.
- [62] Rulmont, A. e Almou, M. "Vibrational spectra of metaborates with infinite chain structure: LiBO₂, CaB₂O₄, SrB₂O₄". *Spectrochimica Acta Part A: Molecular Spectroscopy*, 1989.
- [63] Klopogge, J. T. e Ray L. F. "Raman microscopic study of some borate minerals: Ulexite, kernite, and inderite." *Applied spectroscopy* 53.3 (1999): 356-364.
- [64] Egorysheva, A. V. *et al.* "Vibrational spectra of crystals of bismuth borates." *Crystallography Reports* 50 (2005): 127-136.

- [65] Jun, L. *et al.* "FT-IR and Raman spectroscopic study of hydrated borates." *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy* 51.4 (1995): 519-532.
- [66] Sala, O. "Fundamentos da espectroscopia raman no infravermelho.", (1996).
- [67] Manupriya, *et al.* "Soluble borate glasses: in vitro analysis." *Journal of the American Ceramic Society* 90.2 (2007): 467-471.
- [68] Margha, F. H. e Amr M. A. "Bone bonding ability of some borate bio-glasses and their corresponding glass-ceramic derivatives." *Processing and Application of Ceramics* 6.4 (2012): 183-192.
- [69] Pascuta, P. *et al.* "Structural investigation of bismuth borate glass ceramics containing gadolinium ions by X-ray diffraction and FTIR spectroscopy." *Journal of Materials Science: Materials in Electronics* 20 (2009): 360-365.
- [70] Mihailova, I. K., *et al.* "The effect of the composition on the crystallization behavior of sintered glass-ceramics from blast furnace slag." *Bulgarian Chemical Communications* 43.2 (2011): 293-300.
- [71] Müller, R. *et al.* "Surface crystallization of silicate glasses: nucleation sites and kinetics." *Journal of non-crystalline solids* 274.1-3 (2000): 208-231.
- [72] Erasmus, E. P. *et al.* "Effects of sintering temperature on crystallization and fabrication of porous bioactive glass scaffolds for bone regeneration." *Scientific Reports* 7.1 (2017): 6046.
- [73] Dorozhkin, S. V. "Calcium orthophosphate-based biocomposites and hybrid biomaterials." *Journal of Materials Science* 44.9 (2009): 2343-2387.
- [74] Weinand, W.R. Tese de doutorado. "Hidroxiapatita natural obtida por calcinação de osso de peixe e sua aplicação na produção de materiais compósitos cerâmicos biocompatíveis" Universidade Estadual de Maringá, 2009.
- [75] Rincón-López, J. A. *et al.* "Apatite mineralization process from silicocarnotite bioceramics: mechanism of crystal growth and maturation." *Crystal Growth & Design* 20.6 (2020): 4030-4045.

- [76] El-Batal, F. H. *et al.* "In Vitro bioactivity behavior of some borate glasses and their glass-Ceramic derivatives Containing Zn^{2+} , Ag^+ or Cu^{2+} by immersion in phosphate solution and their anti-Microbial activity." *Silicon* 10 (2018): 943-957.
- [77] Marzouk, M. A., e Batal H. A. El. "In vitro bioactivity of soda lime borate glasses with substituted SrO in sodium phosphate solution." *Processing and Application of Ceramics* 8.3 (2014): 167-177.
- [78] Azami, M. *et al.* "Synthesis and solubility of calcium fluoride/hydroxy-fluorapatite nanocrystals for dental applications." *Ceramics International* 37.6 (2011): 2007-2014.
- [79] Fayos, J. R. *et al.* "Structure of calcium trisodium pentaborate." *Acta Crystallographica Section C: Crystal Structure Communications* 41.10 (1985): 1396-1398.
- [80] Marezio, M., J. P. *et al.* "The crystal structure of the high-pressure phase CaB_2O_4 (IV), and polymorphism in CaB_2O_4 ." *Acta Crystallographica Section B: Structural Crystallography and Crystal Chemistry* 25.5 (1969): 965-970.
- [81] Fayos, J. *et al.* "Structure of calcium sodium pentaborate." *Acta Crystallographica Section C: Crystal Structure Communications* 41.10 (1985): 1394-1396.
- [82] Aslantürk, Ö. S. "*In vitro* cytotoxicity and cell viability assays: principles, advantages, and disadvantages." *Genotoxicity-A predictable risk to our actual world* 2 (2018): 64-80.
- [83] Rogero, S. O., *et al.* "Teste *in vitro* de citotoxicidade: estudo comparativo entre duas metodologias." *Materials Research* 6 (2003): 317-320.
- [84] Flammersheim, H. J. *et al.* "Differential scanning calorimetry." (2003).
- [85] Ionashiro, M. "Princípios Básicos da Termogravimetria e Análise Térmica Diferencial." Araraquara, SP (2004).
- [86] Guinier, A. "X-ray diffraction in crystals, imperfect crystals, and amorphous bodies". Courier Corporation, 1994..
- [87] Suryanarayana, C. *et al.* "X-rays and Diffraction". Springer US, 1998.
- [88] Lee, M. "X-Ray diffraction for materials research: from fundamentals to applications". CRC Press, 2017.

- [89] Atkins, P. *et al.* “Atkins' physical chemistry”. Oxford university press, 2014.
- [90] Hollas, J. M. “Espectroscopia moderna”. John Wiley & Filhos, 2004.
- [91] Griffiths, P. R. "Fourier transform infrared spectrometry." *Science* 222.4621 (1983): 297-302.
- [93] Specac The Basic of ATR-FTIR spectroscopy. Disponível em: <https://specac.com/theory-articles/introduction-to-atr-ftir-spectroscopy-part-1-the-basics> Acessado em 19/08/2023.
- [94] Ferraro J. R. *et al.* “Introductory Raman Espectroscopy”. 2^a ed. Elsevier, 2003;
- [95] Gribov L. A. “The theory of intensities in the infrared spectra of polyatomic molecules, V. I. Vernadsky Institute of Geochemistry and Analytical Chemistry” Academy of Sciences, Moscou. (1995): 217-224.
- [96] Smith B. C. “Infrared Spectral Interpretation”. CRC Press, 1999.
- [97] Dedavid, B. A. *et al.* “Microscopia eletrônica de varredura: aplicações e preparação de amostras: materiais poliméricos, metálicos e semicondutores”. EdiPUCRS, 2007.
- [98] Mehta, R. “Interactions, imaging and spectra in SEM”. INTECH Open Access Publisher, 2012.
- [99] Ul-Hamid, A. “A beginners' guide to scanning electron microscopy”. Vol. 1. Cham, Switzerland: Springer International Publishing, 2018.
- [100] Agilent Technologies, “Microwave plasma atomic emission spectroscopy (MP-AES) – application handbook.” Disponível em: https://www.agilent.com/cs/library/applications/5991-7282EN_MP-AES-eBook.pdf, 2016. Acesso em 27/01/2023.
- [102] Jankowski, K. J. e Reszke E. “Microwave induced plasma analytical spectrometry”. No. 12. Royal Society of Chemistry, 2011.